

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE À FINALITÉ APPROFONDIE

Identification par transposon sequencing des gènes essentiels à la multiplication de *Brucella Abortus* dans les souris

Galia, Malissia

Award date:
2020

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



Faculté des Sciences

**IDENTIFICATION PAR *TRANSPOSON SEQUENCING* DES GENES ESSENTIELS A
LA MULTIPLICATION DE *BRUCELLA ABORTUS* DANS LES SOURIS**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Malissia GALIA
Janvier 2020

**Identification par *transposon sequencing* des gènes essentiels à la
multiplication de *Brucella abortus* dans la souris**

Galia Malissia

Résumé

La brucellose, également appelée fièvre de Malte, est l'une des zoonoses bactériennes les plus fréquentes dans le monde. Elle est causée par des bactéries Gram négative intracellulaire facultative du genre *Brucella* appartenant à la famille des α -protéobactéries. Les animaux sauvages et domestiques peuvent être infectés par *Brucella* avec pour conséquence l'avortement chez les femelles et la stérilité chez les mâles, ce qui occasionne d'importantes pertes économiques. L'humain est un hôte accidentel pour 4 espèces de *Brucella*, dont *B. abortus* et *B. melitensis*. La brucellose humaine résulte principalement de l'ingestion de produits laitiers contaminés non-pasteurisés et d'aérosols générés lors de l'avortement du bétail. Actuellement, les vaccins utilisés pour protéger le bétail, tel que REV1 et S19, sont trop virulent et peuvent induire l'avortement chez le bétail et infecter l'être humain. C'est pourquoi il est nécessaire d'identifier les gènes contrôlant la virulence de *Brucella in vivo* afin de développer un vaccin protecteur dont la virulence chez l'animal et l'humain serait mieux contrôlée.

Durant ce mémoire, nous avons observé que *B. abortus* est plus virulente que *B. melitensis* chez les souris C57BL/6 infectées par voie intranasales. Nous avons ensuite identifié par Transposon Sequencing (Tn-Seq) les gènes bactériens indispensables à l'infection du poumon à 5 et 12 jours et de la rate à 12 jours. Ces 3 conditions ont été comparées entre elles ainsi qu'aux gènes essentiels précédemment identifiés à 5 jours dans le poumon avec *B. melitensis* (thèse de Georges Potemberg). L'analyse de nos résultats Tn-Seq suggère que *B. abortus* fait face à des pressions de sélection moindre dans le poumon que *B. melitensis*. Beaucoup moins de gènes apparaissent essentiels à 5 jours en *B. abortus* en comparaison de *B. melitensis*. Par exemple, les gènes codant pour le système de sécrétion de type IV ou régulant celui-ci, ainsi que des gènes codant pour l'enveloppe bactérienne, sont indispensables pour *B. melitensis* à 5 jours, alors qu'ils ne le deviennent qu'à 12 jours pour *B. abortus*. De même, la pression de sélection dans la rate, connue comme l'un des principaux organes de persistance de *Brucella*, semble plus faible et différente de celle du poumon. Des gènes impliqués dans le système de sécrétion de type IV, dans la synthèse de l'enveloppe bactérienne et du tryptophane n'y sont pas essentiels alors qu'ils le sont dans le poumon.

Dans l'ensemble, nos résultats confirment l'intérêt d'une approche Tn-Seq pour réaliser la carte fonctionnelle du génome de *B. abortus* ainsi que pour aider au développement d'un vaccin atténués contre *Brucella* n'induisant pas d'avortement chez l'animal.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire
Janvier 2020

Promoteur : E. Muraille, **Co-Promoteur** : X. De Bolle

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais remercier mon promoteur, le professeur **Eric Muraille** pour m'avoir intégrée à ce projet très intéressant. Je vous remercie pour le temps passé à me conseiller et corriger mon mémoire. Merci également à mon co-promoteur, le professeur **Xavier De Bolle** pour ses conseils.

Je remercie les membres de mon jury, les professeurs **Arnould, Matroule et De Backer**, et **monsieur Nicolas** pour le temps que vous avez consacré à lire et évaluer le travail effectué durant ces 10 derniers mois.

J'aimerais tout particulièrement remercier mon encadrant, **Georges**. Merci pour ta patience, tes conseils et ton aide tout au long de ce parcours. Merci pour ces karaokés improvisés au BL3 et d'avoir partagé avec moi ces fameuses telenovelas qui m'ont bien fait rire durant nos journées « BL3 ». Merci de m'avoir formée au mieux malgré notre planning hyper chargé et nos semaines de fous.

Je souhaiterais remercier toutes les personnes de l'**URBM** pour leurs conseils et leur aide au quotidien dans le labo. Je souhaiterais particulièrement remercier **Angy** qui m'a appris énormément et aidée de nombreuses fois.

Merci aux mémorantes **Armelle, Adélie et Chantal** pour avoir mis une très bonne ambiance au bureau tout au long de ces mois.

Et enfin je souhaite remercier ma famille, particulièrement **mes parents et ma sœur** pour m'avoir soutenue durant tous ces mois, m'avoir supportée lors de mes explications sur les manip souris. Merci à **mon chéri** pour m'avoir toujours encouragée et pour m'avoir écoutée parler pendant des heures de la vie au labo. Un grand merci à **mes loulous (Gaby et Olivier)** pour m'avoir supportée en période de stress et m'avoir soutenue tout au long de mon parcours.

Merci tout le monde !

TABLE DES MATIERES

Remerciements.....	3
Introduction.....	7
1. <i>Brucella</i> et la brucellose.....	8
1.1. Historique de la découverte de la bactérie <i>Brucella</i>	8
1.2. Les espèces de <i>Brucella</i>	8
1.3. Les symptômes de la brucellose.....	9
1.4. La transmission.....	9
1.5. Le diagnostic de la brucellose.....	10
1.6. Traitement, prévention et vaccination.....	10
2. Cycle intracellulaire de <i>Brucella</i>	10
3. Réponse immunitaire contre <i>Brucella</i>	11
3.1. Le système immunitaire inné et la réponse immunitaire précoce.....	11
3.2. Le système immunitaire adaptatif et la réponse immunitaire tardive.....	13
4. Le modèle expérimental d'infection par <i>Brucella</i> sur souris.....	13
4.1. L'infection par voie intrapéritonéale.....	14
4.2. L'infection par voie intranasale.....	14
5. Le Transposon sequencing et l'identification des gènes essentiels.....	15
5.1. Les transposons et les premières applications.....	15
5.2. La technique du <i>transposon sequencing</i>	15
5.3. Les limitations du <i>transposon sequencing</i>	16
5.4. Les gènes essentiels et atténués découverts chez <i>Brucella</i>	17
Objectifs.....	20
Matériel et méthodes.....	23
1. Matériel.....	24
Souches bactériennes.....	24
Souris et comité d'éthique.....	24
Milieu de culture bactérienne 2YT agar.....	24

Milieu de culture bactérienne 2YT liquide.....	24
Milieu de culture bactérienne TSB liquide et agar.....	25
Solution saline tamponnée au phosphate (PBS 10X).....	25
Milieu de lyse PBS Triton X-100.....	25
2. Méthodes.....	25
Réveil de <i>Brucella</i>	25
Culture liquide de <i>Brucella</i>	25
Infection de souris par <i>Brucella</i>	26
Euthanasie des souris et ablation des organes.....	26
Analyse de la charge bactérienne.....	27
Séquençage transpositionnel.....	27
I. Conjugaison et création de la banque de mutants.....	27
II. Séquençage et traitement informatique.....	28
Construction de mutants.....	28
I. PCR et purification sur colonne.....	28
II. Ligation, transformation et test blanc/bleu.....	28
III. Conjugaison d'un plasmide intégratif entre <i>E. coli</i> DH10B et <i>Brucella abortus</i>	29
Analyses statistiques.....	29
Résultats.....	30
1. Comparaison de l'infection intranasale par <i>Brucella abortus</i> et <i>Brucella melitensis</i> chez les souris C57BL/6.....	31
2. Comparaison des gènes essentiels à la multiplication en milieu riche de <i>Brucella abortus</i> et <i>Brucella melitensis</i>	31
3. Comparaison des gènes essentiels à la multiplication dans le poumon de souris infectées de <i>Brucella abortus</i> et <i>Brucella melitensis</i>	34
4. Comparaison des gènes essentiel à 5 et 12 jours dans le poumon de souris infectées par <i>Brucella abortus</i>	36
5. Comparaison des gènes essentiel à 12 jours dans le poumon et la rate de souris infectées par <i>Brucella abortus</i>	37

Discussion.....	40
Perspectives.....	42
Bibliographie.....	43
Annexes.....	48

Introduction

ESPECES	HÔTE PREFERENTIEL
<i>B. melitensis</i>	Chèvres, moutons
<i>B. abortus</i>	Bovins
<i>B. suis</i>	Cochons
<i>B. canis</i>	Chiens
<i>B. ovis</i>	Moutons
<i>B. neotomae</i>	Rongeurs du désert
<i>B. ceti</i>	Dauphins, baleines (cétacés)
<i>B. microti</i>	Souris
<i>B. pinnipedialis</i>	Phoques
<i>B. papionis</i>	Babouins
<i>B. vulpis</i>	Renards roux
<i>B. <u>Inopinata</u></i>	Hôte inconnu

Tableau 1 : Les espèces de *Brucella* et leur hôte préférentiel (Atluri et al, 2011)

INTRODUCTION

1. Brucella et la brucellose

1.1 Historique de la découverte de la bactérie Brucella

En 79 après J-C, le Vésuve est entré en éruption. Cela a permis de conserver jusqu'à nos jours des corps, objets, ... C'est ainsi que des restes d'ossements ont pu être analysés et des lésions osseuses typiques de la brucellose ont été découvertes. De plus, des fragments de fromages de l'époque contenaient également des coccobacilles ayant une forte ressemblance avec la bactérie *Brucella*, l'agent de la brucellose.

Ce microorganisme a été officiellement découvert par Sir David Bruce en 1887, sous le nom de *Micrococcus melitensis* (actuellement appelé *Brucella melitensis* en honneur à celui-ci). La bactérie fut isolée à partir d'un foie de soldat décédé sur l'île de Malte, d'où le nom fièvre de Malte.

En 1905, Zammit mit en évidence cette bactérie dans du lait de chèvre et a ainsi affirmé la source de cette zoonose. (Godfroid et al. 2005)

Pendant ce temps, Bang a analysé les causes d'avortement d'un troupeau de bovins et a isolé une bactérie surnommée *Bacillus abortus bovinus*. C'est seulement des années plus tard, que la similarité structurale et chimique fut remarquée entre les 2 microorganismes et que l'espèce *Brucella* fut créée. (Meyer 1980)

1.2 Les espèces de Brucella

Brucella est une bactérie Gram négative prenant la forme de coccobacille et faisant partie de la famille des α -protéobactéries (Martirosyan et Gorvel, 2013; Sternon et al, 2018). Ce microorganisme survit extracellulairement mais est principalement intracellulaire chez son hôte. Le génome des espèces *Brucella* se composent de 2 chromosomes circulaires d'environ 2.1 et 1.2 Mbp sauf pour *B. suis* biovar 3 qui présente un seul chromosome de 3.1 Mbp (Halling et al, 2014; Sternon et al, 2018). Il existe une douzaine d'espèces de *Brucella* mais seules certaines espèces sont capables d'infecter accidentellement l'homme : *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* et *B. canis* qui touchent respectivement les moutons, les bovins, les cochons et les chiens (**Tableau 1**) (Atluri et al, 2011; Martirosyan et Gorvel, 2013). De plus, *B. inopinata* a été isolée d'implant mammaire (Scholz et al., 2010). Ces espèces présentent une organisation et des séquences génomiques fortement homologues. Cependant, chacune présente une spécificité d'hôte ainsi qu'une virulence et une cinétique d'infection qui lui est propre. (Atluri et al, 2011; Halling et al, 2014).

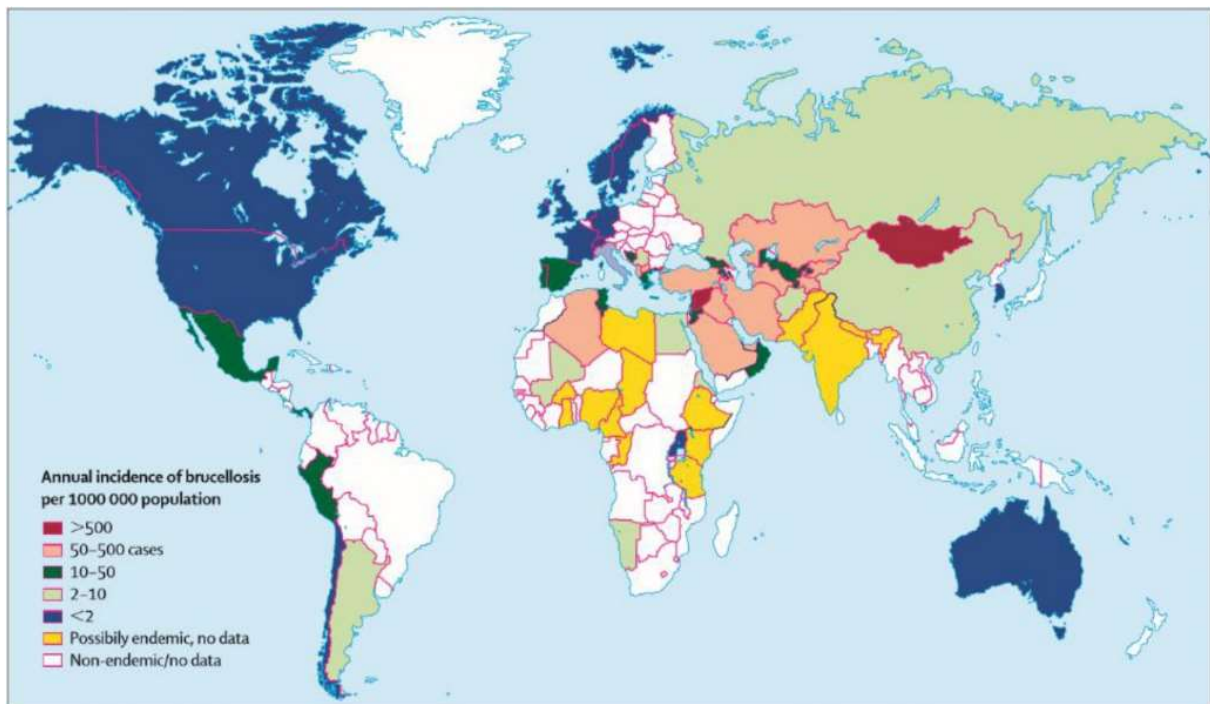


Figure 1 : Incidence de la brucellose dans le monde. L'incidence de la brucellose est très faible en Amérique du nord, l'est de l'Europe et en Australie. Les pays en voie de développement sont les plus touchés. (Pappas et al, 2006)

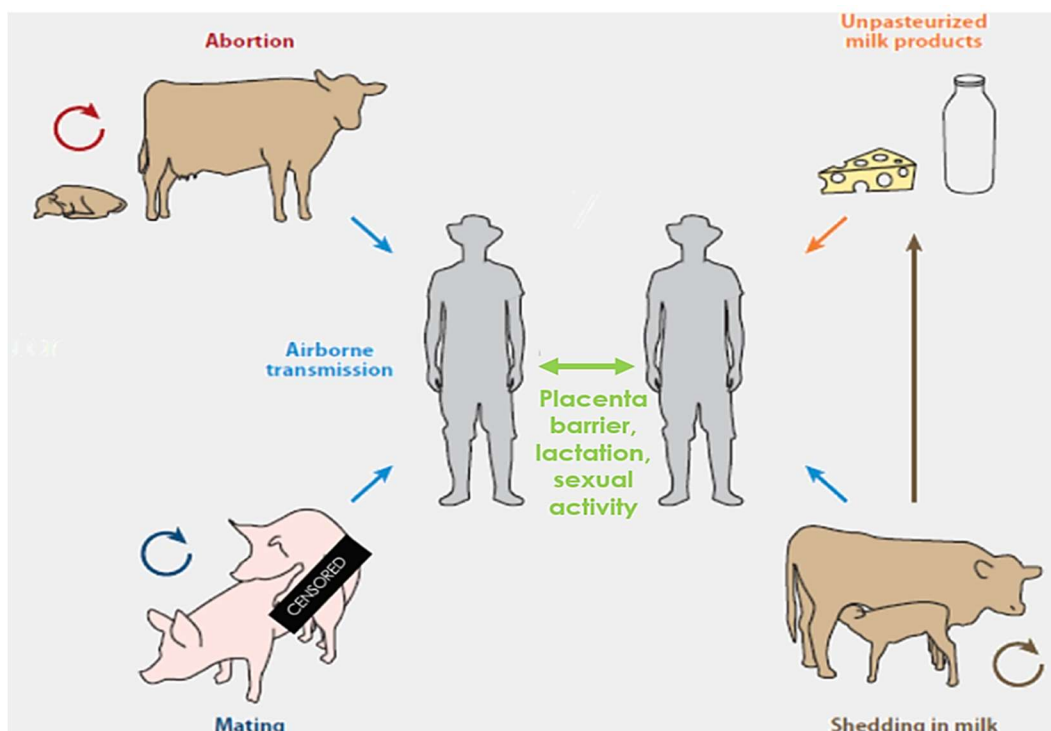


Figure 2 : Modes de transmission de *Brucella*. Les animaux infectés par *Brucella* peuvent infecter d'autres animaux soit lors de la reproduction, de l'avortement ou par ingestion de lait. L'Homme peut aussi être touché s'il entre en contact avec des animaux infectés. La transmission est réalisée par voie aérienne ou par ingestion de produits laitiers non-pasteurisés. La transmission d'homme à homme est très rare. (Modifié à partir d'Atluri, 2011)

1.3 Les symptômes de la brucellose

La maladie causée par l'infection par *Brucella* est appelée brucellose. Également surnommée la fièvre de Malte, celle-ci est l'une des plus fréquentes zoonoses bactériennes rencontrées à travers le monde. En effet, l'Organisation Mondiale de la Santé estime le nombre de cas à 500 000 chaque année. (Atluri et al, 2011 ; Pappas et al. 2006)

Mais l'incidence de cette maladie semble être sous-estimée car les personnes atteintes de brucellose présentent des symptômes semblables à d'autres infections, le diagnostic est difficile et parfois impossible dans les pays en voie de développement. En Australie, dans le nord de l'Amérique et dans les pays du nord de l'Europe, la vaccination et les habitudes alimentaires (cuisson des aliments, pasteurisation) ont permis de réduire drastiquement le nombre de personnes infectées. Cependant, de nombreux pays en voie de développement présentent une haute incidence. Parmi ces régions, l'Amérique centrale et du sud, le nord de l'Afrique, l'Asie centrale et certains pays méditerranéens orientaux. **(Fig.1)** (Atluri et al, 2011 ; Pappas et al. 2006)

Les symptômes varient d'une espèce de *Brucella* à l'autre. En générale, lors de l'infection de l'animal, il y a formation d'hygroma et destruction de cartilage. Mais d'autres symptômes tels que l'avortement et l'infertilité peuvent subvenir (Atluri et al, 2011; Martirosyan et Gorvel, 2013).

Etant donné que le seul moyen efficace d'éradiquer ces bactéries est d'abattre les animaux malades, cela entraîne d'énormes pertes économiques pour les éleveurs (Ficht et al, 2009).

Chez l'homme, les premiers symptômes ressemblent à ceux de la grippe accompagnée d'une fièvre ondulante. Sans traitement, la maladie peut devenir chronique et mener à des complications ostéo-articulaires, neurologiques et cardiaques. Cela engendrera donc une maladie handicapante (Atluri et al, 2011).

1.4 La transmission

Chez les animaux, la transmission est souvent due à l'avortement car l'avorton et les annexes placentaires comportent souvent plus de 10^{14} *Brucella* (Letesson et al., 2017). Le contact de sécrétions lors de l'accouplement et l'ingestion de lait contenant cette bactérie sont aussi d'autres moyens de transmission (Atluri et al., 2011).

Certaines espèces de *Brucella* citées précédemment, sont capables d'infecter l'homme soit par transmission aérienne soit par ingestion de produits laitiers non pasteurisés provenant d'animaux infectés. Dans certains cas très rares, la transmission interhumaine à travers la barrière placentaire, par la lactation et les rapports sexuels ont été reportées (Palanduz et al, 2000; Meltzer et al, 2010, Atluri et al, 2011). **(Fig.2)** Une autre cause pourrait expliquer que les nouveau-nés sont infectés par *Brucella* mais la mère n'en est pas forcément responsable. En effet, des chercheurs ont démontré que chez le nouveau-né non-infecté par *Brucella* à la naissance, une transfusion sanguine peut transmettre cette bactérie (Akçakuş et al, 2005 ; Mosayebi et al, 2005).

1.5 Le diagnostic de la brucellose

Différentes méthodes sont utilisées pour diagnostiquer la brucellose :

- Les tests sérologiques comme le test d'agglutination Rose Bengale ou le test de Coombs ont l'avantage d'être très sensibles et rapides. Si des anticorps sont présents dans le sérum du patient, il y a agglutination avec les antigènes de *Brucella* testés comme par exemple, des fragments de protéines membranaires. (Borsa et al. 2016; Mol Pinto da Silva et al, 2012)
- La PCR est une technique très sensible pour détecter des gènes spécifiques de *Brucella* comme le gène de l'ARN ribosomal 16S
- Le test ELISA met en évidence le LPS de *Brucella* dans le sérum. Cependant, des faux-positifs peuvent apparaître dus aux *crosslinking* avec d'autres bactéries
- La réaction de fixation du complément détecte spécifiquement les immunoglobulines de type G
- Quant aux cultures de *Brucella*, il est difficile de les réaliser car cette bactérie a besoin d'un milieu riche pour croître. De plus, les contaminants du prélèvement rendent son isolation compliquée. Il faut donc utiliser des antibiotiques comme la polymyxine ou l'acide nalidixique. Enfin, un laboratoire de biosécurité de niveau 3 ainsi que du personnel compétent sont nécessaires. (Mol Pinto da Silva et al, 2012).

1.6 Traitement, prévention et vaccination

Le traitement recommandé par l'OMS lors d'une infection en phase aiguë repose sur l'administration per os des antibiotiques doxycycline et rifampicine pendant 6 semaines.

En prévention, il est conseillé de consommer des aliments cuits et les produits laitiers doivent être pasteurisés. Les personnes qui sont susceptibles d'entrer en contact avec cette bactérie comme les vétérinaires, doivent porter des gants et masques.

Les vaccins atténués, comme le vaccin S19 contre *B. abortus* et le REV1 contre *B. melitensis*, sont capables de protéger le bétail contre la brucellose mais ils peuvent induire des avortements et sont virulents pour l'homme (Ficht et al, 2009). Certains vaccins expérimentaux contenant un lysat cellulaire inactivé, un peptide synthétique et des sous-unités ont été développés. Mais ils induisent un faible taux de protection chez le bétail. Il serait donc intéressant de développer un vaccin vivant atténué contre la brucellose dont la virulence soit mieux contrôlée et qui n'induit pas d'avortements (Lauring, Jones & Andino, 2010).

2. Cycle intracellulaire de *Brucella*

Brucella est capable d'infecter différents types cellulaires comme des cellules phagocytaires (macrophages, cellules dendritiques) et des cellules non-phagocytaires (par exemple, les trophoblastes placentaires). Les cellules phagocytaires internalisent *Brucella* soit par opsonisation soit par endocytose grâce aux lipides membranaires de la cellule hôte. Lors de l'opsonisation, la bactérie est la cible d'anticorps spécifiques IgG qui permettront aux récepteurs Fc son intégration dans la cellule. (Martirosyan et Gorvel, 2013)

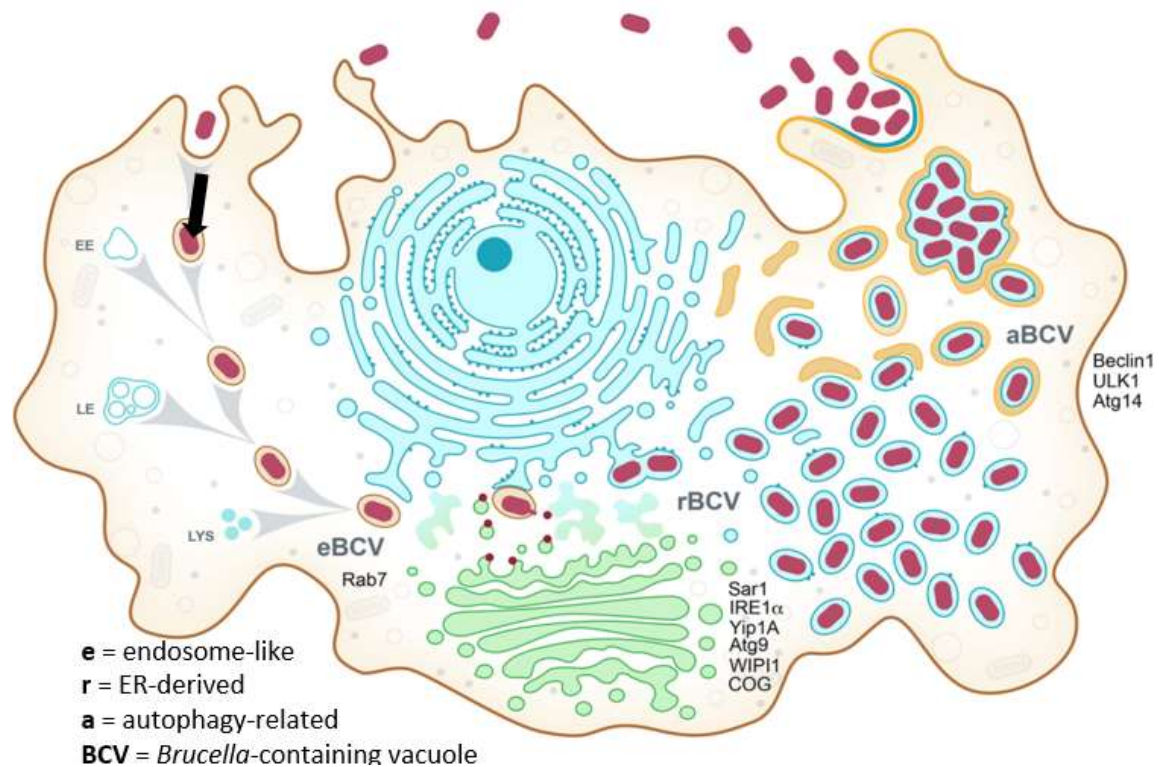


Figure 3 : Entrée et trafic intracellulaire de *Brucella*. Après endocytose, *Brucella* est contenue dans une vacuole (BCV). L'acidification de cette vacuole, suite à la fusion avec les endosomes va induire l'expression de l'opéron *virB* codant pour le système de sécrétion de type IV (T4SS). Ce système de sécrétion va permettre à la bactérie d'atteindre sa niche répliquative, le réticulum endoplasmique et d'échapper au phagolysosome. Ensuite, ces nouvelles bactéries vont être enveloppées par un autophagosome qui les mènera vers le milieu extracellulaire. Cette dernière étape permet la propagation de l'infection aux autres cellules. (Modifié à partir de Celli, 2019)

Suite à son endocytose, *Brucella* est contenue dans une vacuole (BCV). L'acidification du BCV suite à la fusion avec les endosomes précoces va induire l'expression de l'opéron *virB* codant pour le système de sécrétion de type IV (T4SS). Ce système de sécrétion va permettre à la bactérie d'atteindre sa niche répliquative, le réticulum endoplasmique et d'échapper au phagolysosome. C'est dans cette niche qu'elle va se multiplier. Ensuite, ces bactéries « naissantes » vont être enveloppées par un autophagosome qui les mènera vers le milieu extracellulaire. Cette dernière étape favorise ainsi, la propagation de l'infection aux autres cellules. (Fig.3) (Atluri et al, 2011 ; Celli, 2019)

Si *Brucella* est opsonisée, elle se réplique dans une vacuole indépendante du réticulum endoplasmique (Bellaire et al, 2005).

3. Réponse immunitaire contre *Brucella*

Le système immunitaire se définit comme un ensemble de processus de défense permettant la discrimination du soi et du non-soi. Ce système se divise fonctionnellement en 2 catégories : le système immunitaire inné et adaptatif. Ceux-ci sont hautement complémentaires. C'est leur interaction qui permet de mettre en place une réponse immunitaire adaptée et spécifique contre un pathogène.

3.1 Le système immunitaire inné et la réponse immunitaire précoce

Dès l'apparition d'un pathogène dans l'organisme, la réponse innée intervient. Elle est indispensable pour contrôler et limiter la répllication des pathogènes dès leur pénétration dans l'organisme. Elle aide également à la mise en place de la réponse adaptative afin que l'élimination des microorganismes soit optimale.

De nombreux acteurs font partie du système immunitaire inné :

- Les cellules dendritiques sont des cellules sentinelles dérivées des monocytes. Ce sont les principales cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPA) capable d'activer les lymphocytes T naïfs. De plus, en sécrétant des cytokines inflammatoires, elles permettent la différenciation des lymphocytes T en Th1, Th2 et Th17.
- Les granulocytes neutrophiles proviennent des cellules myéloïdes. Ils migrent jusqu'au site d'infection grâce à des chemokines inflammatoires et phagocytent les pathogènes. Ils peuvent éliminer les pathogènes par la phagocytose et la production d'espèces réactives de l'oxygène (O_2^- et H_2O_2 notamment) ou par la dégranulation. En plus du contenu de leurs granules, les neutrophiles peuvent expulser leur propre matériel génétique et former un réseau limitant la diffusion des bactéries extracellulaires.
- Les cellules natural killer dérivent de la lignée lymphoïde. Elles engendrent la mort cellulaire programmée des cellules reconnues comme infectées, grâce à la sécrétion de perforines et granzymes qui forment un pore dans la membrane cellulaire.

- Les monocytes sont des cellules myéloïdes, qui lors d'une infection, se différencient en macrophages. Ils phagocytent les pathogènes et les éliminent soit grâce à la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote soit grâce à l'internalisation dans le phagolysosome et son acidification et également, par la production de peptides antimicrobiens. Ces cellules sont les principales productrices de cytokines pro-inflammatoires.
- Le complément est un ensemble de protéines plasmatiques qui a la capacité de former le complexe d'attaque membranaire. Il a aussi pour rôle de faciliter la phagocytose par opsonisation, d'augmenter la perméabilité vasculaire et de stimuler l'expression des molécules d'adhésion de l'épithélium.

A la surface des cellules du système immunitaire inné, se trouvent des *Pattern Recognition Receptors* (PRRs). Leur rôle est de détecter les *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs), petits motifs moléculaires caractéristiques des microorganismes extrêmement conservés et les *Damage Associated Molecular Patterns* (DAMPs), molécules signalant des dommages tissulaires et cellulaires. On distingue ceux impliqués dans la signalisation comme les *Toll Like Receptors* (TLRs) ou les *NOD Like Receptors*, les *scavenger receptors*, eux, facilitent l'endocytose et enfin, il y a les PRRs sécrétés comme le complément.

La détection des PAMPs et des DAMPs par les PRRs va engendrer une réponse inflammatoire et immunitaire grâce à la sécrétion de cytokines. Les cellules dendritiques activées se dirigeront vers les ganglions et présenteront l'antigène aux lymphocytes T. (Abbas et al, 2015)

Les macrophages alvéolaires et les cellules dendritiques sont capables de détecter *Brucella* grâce aux TLR4 et TLR9. Le TLR4 distingue les lipoprotéines microbiennes et le TLR9 est sensible à l'ADN bactérien. Les macrophages et cellules dendritiques activés vont alors produire l'IL-12 et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α). D'autres cellules comme les cellules épithéliales du tractus respiratoire, peuvent aussi exprimer ces récepteurs. De plus, les lymphocytes T $\gamma\delta$ activés par les cytokines inflammatoires vont produire l'IL-17. Cette interleukine va mener à l'activation, la maturation et la migration des neutrophiles au site d'infection. Cela caractérise la réponse immunitaire Th17 médiée par l'IL-17. (McAleer et Kolls, 2014)

Cependant, certains pathogènes comme *Brucella* ont évolué et développé la capacité de limiter leur détection par le système immunitaire et diminuer la réaction inflammatoire de l'hôte. En effet, *Brucella* possède une modification de son LPS (chaîne O allongée qui va créer un encombrement stérique) et peut ainsi, plus facilement échapper aux TLR4. Deuxièmement, cette bactérie exprime une flagelline dont le domaine de reconnaissance par le TLR5 est manquant (Atluri et al, 2011). De plus, elle ne comporte pas de capsule, pili et fimbriae qui sont des éléments facilement reconnaissables par le système immunitaire. Une protéine Btp1 ou TcpB en fonction de l'espèce de *Brucella*, altère la détection par les TLR2 et 4. Ainsi, la maturation des cellules dendritiques et la sécrétion des chemokines pro-inflammatoires sont inhibées. Grâce à ces caractéristiques, *Brucella* fuit avec facilité les cellules du système inné et retarde l'activation du système immunitaire adaptatif. (Martirosyan et Gorvel, 2013)

3.2 Le système immunitaire adaptatif et la réponse immunitaire tardive

Si le pathogène n'est pas éliminé par la réponse innée, une réponse immunitaire adaptative est initiée. Elle prend plusieurs jours pour se développer. Durant cette phase, les acteurs principaux sont les lymphocytes B et T qui ciblent spécifiquement le pathogène et l'éliminent. Ces cellules présentent des récepteurs antigéniques soit membranaires soit solubles. Les mutations et recombinaisons de gènes ont permis aux lymphocytes d'exprimer un large panel de récepteurs antigéniques, chacun spécifique d'un antigène cible. Une fois que le récepteur lie son antigène cible, une expansion clonale des lymphocytes est initiée.

En fonction de l'agent pathogène rencontré, le type de réponse immune varie. La réponse immunitaire Th1 est caractérisée par la production de l'IL-12 et de l'IFN- γ et l'activation des lymphocytes T CD8. Cette réponse est essentiellement mise en place pour éliminer les microorganismes intracellulaires et les virus. Les T CD4⁺, également appelés T CD4⁺ helper, présentent un récepteur CD4 reconnaissant le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHCII), qui présente les antigènes extracellulaires. Les cellules T CD4 activées stimulent les lymphocytes T CD8⁺ et B via la sécrétion d'interféron gamma (IFN- γ). Les T CD8⁺ expriment le récepteur CD8 reconnaissant le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHCI), qui présentent les antigènes cytosoliques. Les cellules T CD8⁺ éliminent les cellules infectées grâce à leurs actions cytotoxiques. Les lymphocytes B peuvent sécréter des anticorps spécifiques en fonction de la réponse Th. Ils sont activés soit par les lymphocytes T CD4⁺ soit directement par la détection des PAMPs.

Les lymphocytes B ont la capacité de développer une mémoire immunitaire pour permettre à l'organisme de répondre plus rapidement et efficacement lors d'une prochaine infection due au même microorganisme.

Brucella a également développé des mécanismes lui permettant d'échapper au système immunitaire adaptatif : Cette bactérie a la capacité d'interagir avec le MHCII grâce à son LPS. L'agrégation des MHCII empêche la présentation des antigènes par les T CD4⁺. De plus, *Brucella* inhibe la sécrétion d'IL-12 et l'activation des lymphocytes. Cela mène donc à une réponse Th1 altérée. (Martirosyan et Gorvel, 2013)

4. Le modèle expérimental d'infection par *Brucella* sur souris

La souris est le modèle de référence pour l'étude de l'infection par *Brucella* pour plusieurs raisons :

- Les effets de l'infection sont semblables à ceux de l'infection naturelle chez l'hôte
- La réponse immunitaire est bien caractérisée chez la souris
- Un large choix de souris génétiquement déficientes pour des éléments clés de la réponse immune sont disponibles
- La reproduction des souris est rapide et l'entretien n'est pas coûteux (Grilló et al, 2012)

Chez la souris, la brucellose présente 3 phases :

- 1) L'invasion de l'hôte dure 1-2 jours.
- 2) La phase aigüe se déroule entre la 1^{ère} et 3^e semaine d'infection. Les bactéries se multiplient dans les organes du système reproducteur et réticuloendothéliales.
- 3) La phase chronique peut durer des mois voire des années. Entre la 7^e et 12^e semaine, le foie et la rate comportent un nombre de bactéries stable. Ensuite, la population bactérienne décroît progressivement et l'inflammation diminue. Les autres organes peuvent aussi être touchés. (Martirosyan et Gorvel, 2013)

Il est important de souligner que la brucellose se déclare plus ou moins rapidement en fonction de l'espèce de *Brucella*, la dose et la voie d'infection. Certains paramètres de l'hôte comme l'âge, le sexe et la génétique peuvent également favoriser ou non l'évolution de l'infection (Grilló et al, 2012).

Les routes d'infection les plus communes pour *Brucella* chez la souris sont la voie intrapéritonéale, la voie mucoale (intranasale ou orale) et la voie cutanée.

4.1 L'infection par voie intrapéritonéale

L'infection par la voie intrapéritonéale (i.p.) est la plus communément utilisée pour étudier la réponse immunitaire contre *Brucella* chez la souris. Après injection, les bactéries se retrouvent directement dans la cavité péritonéale et le sang puis, colonisent tous les organes. (Demars et al, 2019)

Ce modèle n'est pas représentatif de la voie d'infection naturelle. Il est important de noter que lorsqu'une infection est réalisée par injection intrapéritonéale, les défenses immunes innées mucoales sont contournées. C'est pour ces raisons que le modèle d'infection par voie intranasale a été développé.

4.2 L'infection par voie intranasale

La voie intranasale (i.n.) permet de mimer une voie d'infection naturelle de *Brucella* et permet d'étudier l'importance de l'immunité mucoale. Etant donné que les bactéries font face à toutes les barrières immunitaires, la cinétique d'infection est très différente de celle obtenue après injection intrapéritonéale.

En effet, à 5 jours post-infection, les poumons sont les principaux organes infectés. Et seuls les ganglions médiastinaux et la rate sont infectés jusqu'à 50 jours. Le foie est touché également après 12 jours mais le taux de bactérie chute drastiquement après 28 jours d'infection. Aucune bactérie n'est retrouvée dans le sang mais on suppose que celles-ci passent par la voie sanguine pour migrer vers les autres organes. Les principales cellules infectées dans le poumon lors d'une i.n. sont les macrophages alvéolaires. (Demars et al, 2019)

5. Le Transposon sequencing et l'identification des gènes essentiels

5.1 Les transposons et les premières applications

Les transposons sont des séquences génétiques pouvant s'introduire dans le génome grâce à une enzyme, la transposase, qui reconnaît les séquences répétées inversées du transposon et la région où l'insertion doit avoir lieu. Elle induit une cassure double brin et permet l'insertion du transposon dans le génome. L'utilisation la plus commune des transposons était la mutagenèse d'insertion : chaque microorganisme contient donc un transposon dans une région de leur génome. Cela permettait donc d'établir un lien entre phénotype et génotype. Après quelques années, la mutagenèse *signature-tagged* a été développée et utilisée pour analyser un plus large panel de mutants. Depuis quelques années, grâce aux progrès du séquençage à haut débit, le *transposon sequencing* permet d'analyser de nombreux gènes définis comme essentiels ou non dans des conditions précises. Cette technique a été largement utilisée sur des bactéries Gram positives et négatives mais également sur des champignons pathogènes. Par exemple, des gènes de résistance aux antibiotiques ont été identifiés chez *Pseudomonas aeruginosa*, chez *Mycobacterium tuberculosis* des gènes essentiels ont été découverts dans la voie catabolique du cholestérol. (Opijnen et Camilli, 2013)

Afin de développer de nouveaux candidats pour vaccins vivants atténués, il est nécessaire d'identifier les gènes essentiels à la virulence de *Brucella* lui permettant d'infecter et de persister dans l'hôte. Plusieurs tentatives pour déterminer ces gènes essentiels à *Brucella* ont été réalisées *in vitro* en particulier dans les macrophages RAW264.7 (Lestrade et al, 2000). Cependant, les conditions de sélection utilisées étaient très éloignées de celles d'une infection naturelle. Pour identifier ces gènes essentiels, la mutagenèse *signature-tagged in vivo*, sur souris, était une méthode de choix. Plusieurs gènes essentiels codant pour des transporteurs, le système de sécrétion de type IV et des gènes intervenant dans le métabolisme des acides aminés et de l'ADN, de la synthèse du peptidoglycan ont été identifiés. Lestrade et son équipe (2003) ont découvert 36 gènes essentiels *in vivo* en analysant plus de 1000 mutants de *Brucella melitensis*. Etant donné le nombre important de mutants testés et le peu de gènes essentiels trouvés, les chercheurs se sont rapidement tournés vers le *transposon-sequencing*. L'article de Sternon (2018) a listé près de 500 gènes essentiels à la croissance de *Brucella abortus* en milieu riche et 165 gènes essentiels en macrophages 24h post-infection.

5.2 La technique du transposon sequencing

Le Tn-seq est une technique qui met en évidence virtuellement tous les gènes essentiels d'un génome avec une précision de quelques paires de base. Le Tn5 a été préférentiellement choisi grâce à son site d'insertion random. De plus, le génome de *Brucella* présente une composition légèrement plus riche en GC que d'autres bactéries et ce transposon présente une haute affinité pour ces régions riches en GC. Le Tn5 a été modifié pour présenter aux extrémités des séquences répétées inversées, un promoteur « xylose » et une cassette de résistance à la kanamycine.

Cette modification lui permet de diminuer le biais d'insertion, d'obtenir une meilleure couverture du génome et d'éviter une diminution d'expression des gènes attenants.

Une conjugaison avec *Brucella* et *E. coli* S17-1 contenant un MiniTn5 est réalisée. L'insertion randomisée d'un mini-transposon 5 modifié permet d'obtenir une banque de mutants. Après avoir récolté la banque de mutants (environ de 4.10^6 mutants), les clones ayant incorporé le transposon sont sélectionnés sur milieu riche contenant de la kanamycine. Les clones avec transposon sont alors récoltés et regroupés en un pool.

Une partie de cette banque est inactivée, l'ADN génomique est purifié et ensuite, séquencé par Illumina (Christen et al, 2011). Après séquençage, on peut identifier la quantité de *reads* c'est-à-dire le nombre de séquences alignées sur chaque région du génome de *Brucella*. Les régions où la quantité de *reads* est importante signifie que l'insertion de transposon n'est pas délétère pour la bactérie et celle-ci peut croître sur milieu riche. On identifie alors les gènes non-essentiels à sa croissance sur milieu riche. Tandis que les régions où la quantité de *reads* est très faible indique que l'insertion d'un transposon dans cette région est létale pour de nombreux clones. C'est alors qu'on peut distinguer les gènes essentiels à la survie de *Brucella* en milieu riche.

La seconde partie de la banque de mutants est utilisée pour infecter les souris. Les organes sont ensuite récoltés à des temps post-infection prédéfinis, broyés et en partie étalés sur milieu riche contenant de la kanamycine pour sélectionner les clones contenant le transposon. Après croissance des bactéries, la banque est récoltée, inactivée et l'ADN génomique est purifié pour être séquencé par Illumina. Le nombre de *reads* sur chaque région du génome de *Brucella* est ainsi connu.

Les résultats sont analysés par des logiciels informatiques et des tests statistiques. Pour que l'ensemble de nos résultats soient normalisés, pour chaque chromosome et condition, la moyenne et l'écart-type de la distribution des nombres de *reads* sur le chromosome sont calculés. Chaque Tn-seq est normalisé en utilisant la moyenne obtenue pour le Tn-seq effectué sur milieu riche. Un ratio des moyennes est calculé et appliqué sur l'ensemble du nombre de *reads* par paire de base en \log_{10} pour chaque candidat identifié. Pour définir si le gène est considéré comme « non-essentiel », « atténué » (associé à un fitness réduit), ou « essentiel », la différence entre le nombre de *reads* par paire de base en \log_{10} et le nombre de *reads* en condition contrôle est calculée. Nous définissons ces différentes catégories grâce à l'écart-type. En effet, si la différence équivaut à moins d'un écart-type, nous estimons que ce gène n'est pas essentiel. Si la différence vaut plus d'un écart-type, il est considéré comme atténué. Et si elle vaut plus de deux écarts-type alors le gène est considéré comme essentiel.

5.3 Les limitations du transposon sequencing

Le *transposon sequencing* a malheureusement encore peu été utilisé pour identifier des gènes nécessaires pour faire face à l'immunité innée et adaptative. En effet, une importante limitation doit être soulignée : de nombreuses bactéries peuvent être tuées *in vivo* ce qui entraîne une diminution de la diversité de la population et peut rendre difficile, voire techniquement impossible, l'analyse par Tn-seq.

En effet, une trop grande réduction de la diversité peut causer un effet dit de *bottleneck*, un effet d'échantillonnage (Opijnen et Camilli, 2013) L'absence d'un mutant peut alors être due à l'effet d'échantillonnage et non à l'implication du gène muté dans la survie de la bactérie.

Dans de nombreuses analyses Tn-seq, des faux-positifs et négatifs de gènes essentiels ont été relevés. Le Tn-seq permet une analyse avec une résolution au domaine près lorsque la banque est suffisamment dense. Dans le cas où l'insertion du transposon se situe dans une région non-essentielle d'un gène, il peut être perçu comme non-essentiel même si une autre partie de ce même gène est définie comme essentielle. Ce problème est généralement dû à une analyse automatisée.

Certaines régions peuvent aussi être peu ou pas accessibles pour l'insertion du transposon. En effet, la structure de l'ADN (euchromatine ou hétérochromatine) et les protéines liées à l'ADN sont des facteurs importants. Etant donné la faible densité d'insertion dans ces régions, des gènes non-essentiels peuvent sembler être essentiels car peu de mutants pour les gènes de ces régions sont récupérés.

Des effets polaires peuvent aussi apparaître c'est-à-dire que l'insertion du transposon dans un gène peut inhiber l'expression du gène en aval. Pour éviter ces effets polaires, une cassette permettant la transcription et la traduction dans un sens unique est ajoutée dans le transposon. De plus, il faut savoir que le taux d'insertion diminue lorsqu'un gène est proche des extrémités de réplication. (Goodall et al, 2018)

Il est important de souligner que la notion de gène essentiel dépend de la méthodologie de sélection utilisée et des analyses statistiques appliquées. En effet, les gènes décrits comme essentiels dans certaines conditions peuvent ne pas l'être dans une autre. Par exemple, les gènes codant pour le système de sécrétion de type IV sont essentiels pour *B. abortus* lors d'une infection de macrophages RAW264.7 *in vitro* mais ils ne sont pas essentiels en culture milieu riche TSB (Sternon et al, 2018).

Lors de la mutation de certains gènes essentiels, ceux-ci peuvent être reconnus comme non-essentiels lorsqu'on teste leur virulence. En effet, un mutant transpositionnel ne présentera pas forcément le même phénotype qu'un mutant de délétion. D'autres gènes peuvent muter, se détourner de leur fonction initiale ou augmenter leur expression afin de compenser le gène muté. (Goodall et al, 2018)

5.4 Les gènes essentiels et atténués découverts chez *Brucella*

La virulence, l'intensité du pouvoir pathogène d'une souche bactérienne, dépend de nombreux éléments appelés facteurs de virulence. Ces facteurs permettent notamment à *Brucella* d'atteindre sa niche répliative, le réticulum endoplasmique. Le séquençage à haut débit a permis d'identifier nombre d'entre eux. Parmi ceux-ci, on retrouve le système de sécrétion de type IV encodé par l'opéron *virB*, mais également de nombreux gènes impliqués dans la synthèse du LPS, le métabolisme et d'autres codant pour des transporteurs. En effet, les pathogènes doivent adapter leur métabolisme aux conditions environnementales dans lesquelles ils se trouvent pour survivre. (Barbier et al, 2017)

L'érythritol est considéré comme une source préférentielle de carbone pour certaines espèces de *Brucella*. Les substrats dérivés de l'érythritol interviennent dans la synthèse des hexoses-monophosphate et donc, dans la voie des pentoses phosphate. Les mutations de gènes impliqués dans la voie catabolique de l'érythritol sont toxiques pour la croissance de *Brucella in vitro*. Par exemple, le vaccin *B. abortus* S19 comporte des mutations au niveau de *eryC-eryD* et diminuent ainsi, la croissance des bactéries. (Barbier et al, 2017)

L'apport de carbone nécessaire à la croissance de *Brucella*, peut provenir de différentes formes de substrats. Le carbone provient en partie du lactate. C'est une des sources du pyruvate qui est nécessaire au cycle de Krebs mais également à la gluconéogenèse. Le transporteur de lactate n'est pas essentiel pour *B. abortus* et *B. melitensis* en milieu riche car ces espèces assimilent directement le pyruvate exogène pour alimenter la gluconéogenèse. Un mutant pour la pyruvate kinase de *B. abortus* est reconnu comme atténué.

L'article de Sternon (2018) a mis en évidence l'importance de la synthèse des pyrimidines. En effet, les mutants des gènes impliqués dans cette voie métabolique *pyrB*, *pyrC*, *pyrD*, *pyrE*, *pyrF* de *B. abortus* sont fortement atténués lors d'une infection en macrophages RAW 264.7. Une autre voie de synthèse aussi importante pour *B. abortus* est celle de l'histidine. En effet, de nombreux gènes mutés impliqués dans cette voie de synthèse sont fortement atténués dans le cas d'une infection en macrophages RAW 264.7.

Le glucose-6-phosphate est au centre d'une multitude de voies métaboliques : la voie d'Embden-Meyerhoff-Parnass, la voie des pentoses phosphate et la voie d'Entner-Doudoroff. Ce qui fait de ce substrat une molécule nécessaire à la croissance de *Brucella*. Le glucose est importé par le transporteur GluP. Celui-ci est décrit comme essentiel pour l'infection en souris et son mutant est atténué lors d'une infection en macrophages. Ensuite, la glucokinase mène à la formation de glucose-6-P. En mutant cette enzyme, la croissance de *Brucella* en utilisant uniquement le glucose comme source d'énergie est impossible. (Barbier et al, 2017) *Brucella* utilise des carbohydrates de faible poids moléculaire et des acides aminés comme source d'énergie et de carbone. Des porines permettant l'assimilation de ces nutriments par la bactérie ont été décrites comme essentielles *in vivo* (24h post-infection chez la souris) chez *B. abortus* et *in vitro* (48h post-infection en macrophages) chez *B. suis* et *B. melitensis*. De plus, certains transporteurs semblent être nécessaires à l'assimilation de glucose/galactose. Et de nombreux ATP-binding cassette transporteurs permettent également l'import de nutriments. (Barbier et al, 2017 ; Garmony et Titball, 2004)

Lestrade et al (2003) ont démontré que lors d'une infection en souris certains mutants sont atténués. Parmi ceux-ci, on retrouve des gènes impliqués dans le transport de glycérol, le métabolisme, la régulation transcriptionnelle et la synthèse du LPS.

Le glycérol est une source importante d'énergie et de carbone. Selon cette étude, il semblerait que la glycérol kinase soit essentiel pour *B. melitensis*. Le glycérol-3-phosphate (G3P) permet la formation de dihydroxyacétone-3-P nécessaire à la voie d'Embden-Meyerhoff-Parnass. L'enzyme permettant cette transformation est la G3P déshydrogénase. Le mutant de cette enzyme nommée GlpD, est atténué chez *B. melitensis*. (Barbier et al, 2017)

D'autres études ont également mis en évidence l'importance de la voie de synthèse des purines et des pyrimidines. Alcantara et son équipe (2004) ont démontré que les mutants de *purE*, *purL* et *purD* pour *B. abortus* sont significativement atténués lors d'une infection sur souris. Truong et al (2014) ont découvert que la mutation de *purD* et *purF* atténue fortement la virulence de *Brucella abortus* en infection souris. Vu la nécessité de ces voies de biosynthèse, cela laisse suggérer que ces substrats sont peu disponibles dans la niche répliquative.

Les voies métaboliques sont régulées par différents systèmes. Le système senseur de régulation BvrS/R est impliqué dans la régulation de l'expression de porines et du lipide A. Les mutants de ce système sont atténués dans tous les modèles d'infection testés. Le quorum sensing agit via deux éléments régulateurs de la transcription : VjbR et BabR. VjbR ralentit le métabolisme du carbone de *Brucella* afin que celle-ci ne puisse se multiplier en dehors de sa niche répliquative. Dans le réticulum endoplasmique, BabR aide à retrouver le niveau basal du métabolisme. Ces mutants sont tous atténués lors d'une infection en souris. (Lestrade et al, 2000 ; Barbier et al, 2017)

Dans le cas d'une infection avec *B. melitensis* en modèle chèvre, des gènes impliqués dans la synthèse du LPS (*lpsA*) et du système de sécrétion de type IV (*virB6* et *8*) sont reconnus comme atténués. (Zygmunt et al, 2006)

Objectifs

OBJECTIFS

Actuellement, les seuls vaccins protecteurs contre *Brucella* utilisés chez le bétail sont des vaccins vivants atténués. Mais leur virulence est trop importante, ils induisent notamment des avortements, source de perte économique mais aussi de contamination pour l'homme. Il serait donc intéressant de développer un vaccin vivant atténué contre la brucellose dont la virulence serait mieux contrôlée et qui n'induirait pas d'effets secondaires, ce qui nécessite de disposer d'une carte fonctionnelle du génome de *Brucella*.

L'objectif principal de ce mémoire était d'identifier dans le modèle souris les gènes essentiels à la multiplication et à la persistance de *Brucella*, en particulier les gènes impliqués dans l'échappement à la réponse immunitaire innée et adaptative.

La méthode utilisée pour réaliser cette analyse est le *transposon sequencing* (Tn-seq). Celui-ci combine la mutagenèse par insertion de transposon avec le séquençage à haut débit des sites d'insertion du transposon afin d'identifier les gènes contribuant à une fonction d'intérêt pour les bactéries. Il permet d'analyser en une seule expérience l'ensemble du génome bactérien avec une précision de quelques paires de base. En pratique, un mini-transposon 5 (Tn5) modifié est inséré aléatoirement dans le génome de *Brucella* afin d'obtenir une banque de mutants. Cette banque est alors soumise à une pression de sélection (milieu riche ou infection souris) et les sites d'insertion des mutants survivants sont ensuite séquencés puis alignés sur le génome bactérien afin d'identifier les gènes candidats atténués ou essentiels. Les résultats sont analysés à l'aide de logiciels informatiques et de tests statistiques.

Pour notre étude, nous avons choisi de travailler principalement sur *B. abortus* car cette espèce survit plus longtemps et à un taux supérieur dans les poumons des souris C57BL/6 infectées que *B. melitensis* (Kahl-McDonagh, Gamboa & Ficht, 2007). Cela permet donc d'éviter les effets de *bottleneck* lors de la réalisation d'un Tn-seq à un temps tardif de l'infection, lorsque le système adaptatif est activé chez la souris.

Dans un premier temps, nous avons comparé les gènes essentiels requis à la multiplication de *B. melitensis* et *B. abortus* en milieu riche. Cette comparaison nous a permis de mettre en évidence que ces deux bactéries présentent déjà des exigences métaboliques spécifiques *in vitro*. Dans un second temps, après avoir identifié les conditions les plus propices (poumon à 5 et 12 jours et rate à 12 jours post infection), les expériences de Tn-seq *in vivo* ont été réalisées avec *B. abortus* chez la souris et analysées.

Enfin, des gènes essentiels identifiés lors de nos analyses Tn-seq ont été sélectionnés comme candidat pour créer des mutants de délétion. Ces mutants ont été injectés chez la souris pour évaluer leur virulence et leur persistance dans les organes.

Matériel et méthodes

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel

Souches bactériennes

Pour nos expériences, nous avons utilisé *Brucella abortus* 2308 de type sauvage (WT) et *Brucella melitensis* 16M de type sauvage (biotype 1, ATCC 23456) qui sont naturellement résistantes à l'acide nalidixique (NalR). L'espèce *Brucella melitensis* 16M a été génétiquement modifiée pour exprimer constitutivement un gène codant pour le fluorochrome mCherry et est résistante à l'acide nalidixique et la kanamycine (KanR) (Copin et al., 2012). Les espèces de *Brucella* sont conservées dans des congélateurs à -80 °C dans une solution contenant 30% de glycérol et sont manipulées dans le laboratoire de biosécurité de niveau III (Université de Namur, Belgique).

Souris et comité d'éthique

Nous avons sélectionné pour nos expériences, des souris C57BL/6 âgées de 8 semaines à 4 mois. L'élevage de souris se situe à l'institut de biologie moléculaire et de médecine (IBMM) à Gosselies en Belgique. Les procédures utilisées dans cette étude sont conformes à la législation européenne en vigueur (directive 86/609/CEE) et à la loi belge correspondante « Arrêté royal relatif à la protection des animaux d'expérience du 6 avril 2010 publié le 14 mai 2010 ». Le Comité du bien-être animal de l'Université de Namur a approuvé le protocole complet décrivant nos expériences (numéro de permis : UN-LE/ 19-330).

Milieu de culture bactérienne 2YT agar

- Ajouter 44 gr de 2YT agar (20 g/L de milieu de culture LB, 13 g/L d'agar, 6 g/L de peptone et 5 g/L d'extrait de levure) dans 1L d'eau déminéralisée et autoclaver la solution.
- Si un antibiotique est nécessaire : Ajouter 1mL d'ATB dans 1L de milieu et homogénéiser.

Pour la kanamycine : Préparer une solution de 50 mg/mL et dissoudre dans de l'eau déionisée. Filtrer la solution stérilement et l'aliquoter.

Pour l'acide nalidixique : Préparer une solution de 25 mg/mL d'ATB et le dissoudre dans du NaOH 0.2M. Filtrer la solution stérilement et l'aliquoter.

Milieu de culture bactérienne 2YT liquide

- Ajouter 31 gr de 2YT (20 g/L de milieu de culture LB, 6 g/L de peptone et 5 g/L d'extrait de levure) dans 1L d'eau déminéralisée et autoclaver la solution.

Milieux de culture bactérienne TSB liquide et agar

- Pour obtenir du TSB liquide : ajouter 30 gr du mix prêt à l'emploi dans 1L d'eau déminéralisée
- Pour obtenir du TSB agar : utiliser le mix prêt à l'emploi du TSB liquide et ajouter à celui-ci 15 gr dans 1L d'eau déminéralisée
- Autoclaver la solution

Solution saline tamponnée au phosphate (PBS 10X)

- Ajouter 80 g/L de NaCl, 2 g/L de KCl, 11,5 g/L de Na₂HPO₄ et 2,4 g/L de KH₂PO₄ dans 1 L d'eau bidistillée ;
- Mélanger à l'agitateur magnétique ;
- Mettre à pH (7-7,4) ;
- Conserver à température ambiante.

Milieu de lyse PBS Triton X-100

- Dans 1L de PBS 1X, ajouter 1mL de Triton avec un tips coupé
- Autoclaver et conserver à température ambiante

2. Méthodes

Réveil de Brucella

- Sortir la souche de *Brucella* du congélateur à -80°C du BL3 et la transporter sur portoir de refroidissement
- A l'aide d'une anse, récolter les bactéries et les étaler sur boîte de Pétri 2YT agar (*B. melitensis*) ou TSB agar (*B. abortus*)
- Incuber à 37°C pendant 4 jours environ

Culture liquide de Brucella

- A l'aide d'une anse, récolter les colonies provenant de la boîte de Pétri du réveil de la souche
- Disposer les *Brucella* dans 10mL de milieu de culture liquide adéquat (2YT ou TSB) et préparer un tube contrôle contenant uniquement le milieu de culture liquide pour vérifier la stérilité du milieu
- Incuber sous agitation à 37°C dans l'incubateur du BL3 toute la nuit

Infection des souris par Brucella

- 16 heures avant l'infection, les cultures liquides sont effectuées dans du milieu TSB ou 2YT liquide et incubées à 37°C sous agitation.
- Le jour de l'infection, mesurer la densité optique de la culture bactérienne (DO) au spectrophotomètre à 600 nm. La dose infectieuse doit présenter un DO entre 0.8 et 1.2, ce qui correspond à la fin de la phase exponentielle de croissance. Une DO de 1 équivaut à 3×10^9 bactéries/mL.
- Centrifuger les cultures 10min à 3500 RPM à température ambiante (RT)
- Effectuer 2 lavages à l'aide de 10 mL de RPMI
- Resuspendre le culot dans 10 mL de RPMI et mesurer la DO à 600 nm
- Calculer la dose infectante :

$$\text{Facteur de dilution} = \frac{\text{DO}_{600\text{nm}} \times 3.10^9}{\text{Nombre de bactérie/mL}}$$

Volume à prélever de la solution initiale et diluer dans du RPMI :

Volume final (en fonction du nombre de souris à injecter) / facteur de dilution

- Avant l'infection, anesthésier les souris par injection intrapéritonéale d'un mélange de Xylazine XYL-M 2% (11,25 µL/25 gr de souris) et de Kétamine 1000 (18 µL/25 gr de souris) dans du PBS (400 µL/ 25 gr de souris).
- Infecter les souris par injection intranasale avec 30 µl de la dose infectieuse contenant 5.10^6 bactéries/souris.
- Etaler les dilutions en série de l'inoculum pour effectuer un contrôle de dose infectieuse

Euthanasie des souris et ablation des organes

- Disloquer les cervicales des souris afin de les euthanasier 5, 12 ou 28 jours après l'infection
- Pour prélever les organes, les souris sont couchées sur leur flanc droit
- Stériliser les instruments dans de l'éthanol 70%
- Asperger les souris d'éthanol 70% et couper la peau superficiellement du haut de la cuisse jusqu'à la patte avant
- Asperger le péritoine d'éthanol 70% et couper
- Récolter la rate et le foie en coupant les adhérences
- Casser la cage thoracique, déchirer le diaphragme et prélever les poumons en coupant les adhérences

Analyse de la charge bactérienne (CFU)

- Après avoir pesé les organes récoltés 5, 12 ou 28 jours après infection, les plonger dans 1 mL de PBS-Triton X-100
- A l'aide de l'Ultraturax, broyer les organes
- Effectuer des dilutions en série et étaler sur boîte de Pétri contenant du TSB agar pour *B. abortus* ou du 2YT agar pour *B. melitensis*
- Incuber à 37°C pendant 5 jours
- Compter les CFU pour évaluer la charge bactérienne dans ces organes

Séquençage transpositionnel

I. Conjugaison et création de la banque de mutants

- Préparer les cultures de *B. melitensis* 16M WT dans 10mL de 2YT liquide ou *B. abortus* 2308 dans 10mL de TSB liquide.
- Préparer également une culture de *E. coli* S17-1 comportant un MiniTn5 appelé Ferrari (Christen et al., 2011) dans 10mL de LB liquide et ajouter 10 µl de kanamycine et d'ampicilline
- Le lendemain, ajouter 1mL de la culture liquide de *Brucella* à 50µL de *E. coli* S17-1 MiniTn5. Centrifuger et laver avec du milieu liquide adéquat pour éliminer les ATB. Etaler 100 µl sur boîte de Pétri contenant soit du 2YT ou du TSB agar et incuber à température ambiante pendant toute la nuit. Au minimum 8 conjugaisons doivent être réalisées pour former la banque.
- Collecter et diluer les conjugaisons afin d'étaler les bactéries sur 120 boîtes de Pétri contenant du TSB ou du 2YT avec kanamycine et acide nalidixique afin de sélectionner les *Brucella* comportant le Tn. Incuber à 37°C jusqu'à croissance de *Brucella*. L'entière de la banque devrait être d'environ $1-2 \cdot 10^6$ mutants.
- Racler la banque avec 2mL de milieu liquide. Diluer et étaler sur des boîtes de Pétri 2YT ou TSB agar selon l'espèce de *Brucella*.
- Cette banque est aussi utilisée pour infecter les souris (voir partie infection des souris)
- Extraire la banque de mutants des organes collectés à des temps post-infection déterminés. Etaler sur boîtes de Pétri TSB agar et incuber à 37°C.
- Récolter la banque de ces boîtes avec 2mL de milieu liquide
- Inactiver les clones avec du SDS 2% à 80°C pendant 1h
- Pour récupérer l'ADN génomique :

Ajouter 600µL de Tris EDTA NaCl +30µL de SDS 10% + 3µL de protéinase K à 100µL des clones. Incuber 3 jours à 37°C. Récolter le surnageant et y ajouter de l'isopropanol 100% froid. Centrifuger, retirer le surnageant et introduire de l'éthanol froid à -20°C. Centrifuger à 4°C pendant 10 min et évacuer le surnageant. Resuspendre dans de l'eau déminéralisée et mesurer la quantité d'ADN par Qbit.

II. Séquençage et traitement informatique

La firme Fasteris s'occupe de la préparation de la banque et du séquençage. Ensuite, d'autres programmes informatiques sont également utilisés. Galaxy aligne les *reads* sur le génome, les ordonne par paire de base et analyse la couverture des *reads* par paire de base pour tout le génome. Notepad++ permet la division des chromosomes et Excel calcule le nombre de *reads* par paire de base en \log_{10} . Le programme Artemis permet de visualiser le nombre de *reads* par base à l'aide d'un R100. Selon l'article de Sternon et al (2018), ce facteur permet d'analyser le génome indépendamment des annotations de chaque gène. Ce qui est équivalent à un \log_{10} du nombre de *reads* dans une fenêtre de 100 paires de bases.

Successivement, diverses étapes sont réalisées afin de normaliser nos résultats. Pour chaque chromosome et chaque condition, la moyenne et l'écart-type de la distribution du nombre de reads sur le chromosome sont calculés. La normalisation de chaque Tn-seq est réalisé suivant la moyenne du Tn-seq effectué en milieu riche. Pour ce faire, un ratio de moyennes est calculé et appliqué aux nombres de *reads* par paire de base en \log_{10} pour chaque candidat identifié.

Construction de mutants

I. PCR et purification sur colonne

- Une amplification d'un fragment du génome est effectuée par PCR grâce à des amorces spécifiques :

Pour 1 μ L d'ADN génomique :

- 10 μ L de tampon Q5 5X
 - 4 μ L de dNTPs
 - 1 μ L d'amorce sens
 - 1 μ L d'amorce anti-sens
 - 0.5 μ L de polymérase Q5
 - 32.5 μ L d'eau déminéralisée
- Disposer 15 μ L d'échantillons amplifiés dans les puits d'un gel d'agarose 1% comportant 5 μ L de bromure d'éthidium. Faire migrer.

II. Ligation, transformation et test blanc/bleu

Après avoir effectué la restriction à l'aide de l'enzyme de restriction EcoRV la ligation est réalisée :

- Ajouter dans un eppendorf 1 μ L de ligase d'ADN, 2 μ L de tampon 5x, 6 μ L du produit de la PCR et 1 μ L du plasmide pNPTS138 coupé en EcoRV
- Laisser à RT pendant toute une nuit

Pour effectuer la transformation et le test blanc/bleu :

- Ajouter 5 μ L du produit de ligation à 50 μ L de cellules compétentes
- Placer 30 min sur glace
- Réaliser un choc thermique : 1 min dans le bain-marie à 42°C puis 2 min sur glace

- Ajouter du milieu liquide LB et mettre sous agitation à 37°C pendant 45 min
- Etaler 100µL sur boîte de Pétri contenant du LB agar, Chloramphénicol, X-gal, IPTG
- Incuber à 37°C toute la nuit
- Réaliser une PCR diagnostique sur les colonies blanches

III. Conjugaison d'un plasmide intégratif entre *E. coli* DH10B et *Brucella abortus*

- Lancer la culture de *E. coli* DH10B contenant le plasmide d'intérêt, la culture d'une souche helper et la culture de *Brucella*. Incuber à 37°C toute la nuit.
- Ajouter dans un eppendorf 1mL de *Brucella*, 50µL d'helper et 50µL d'*E. coli*. Laver avec du 2YT liquide puis déposer en spot sur une boîte de Pétri contenant du 2YT agar. Incuber toute la nuit à 37°C
- Récupérer la moitié du spot et diluer avec du 2YT liquide. Etaler sur boîte de Pétri contenant du 2YT agar et de l'acide nalidixique. Incuber à 37°C jusqu'à croissance des *Brucella*
- Strier des clones sur boîte de Pétri avec du 2YT agar et kanamycine
- Récupérer une strie suffisamment épaisse et lancer la culture liquide en 2YT à 37°C pendant 18-24h
- Etaler sur des boîtes de Pétri contenant du 2YT agar et du sucrose 5% et incuber à 37°C jusqu'à croissance des colonies
- Strier plusieurs dizaines de clones sur milieu 2YT agar + kanamycine puis sur milieu 2YT sucrose 5% et incuber à 37°C
- Après croissance des bactéries, récupérer quelques colonies des stries sucrose résistantes et kanamycine sensibles dans 100µL d'eau déminéralisée. Inactiver à 80°C pendant 1h
- Réaliser une PCR check pour vérifier l'absence du gène à déléter

Analyses statistiques

GraphPad Prism est un logiciel informatique qui permet d'effectuer des analyses statistiques lors des comparaisons entre les niveaux d'infection chez les souris. Le test impair Mann-Whitney, un t-test non-paramétrique compare chaque groupe de souris infectées à chaque temps de prélèvement post-infection et pour chaque organe. Les valeurs de p inférieures à 0.05 mettent en évidence une différence significative : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ et **** $p < 0.0001$.

Résultats

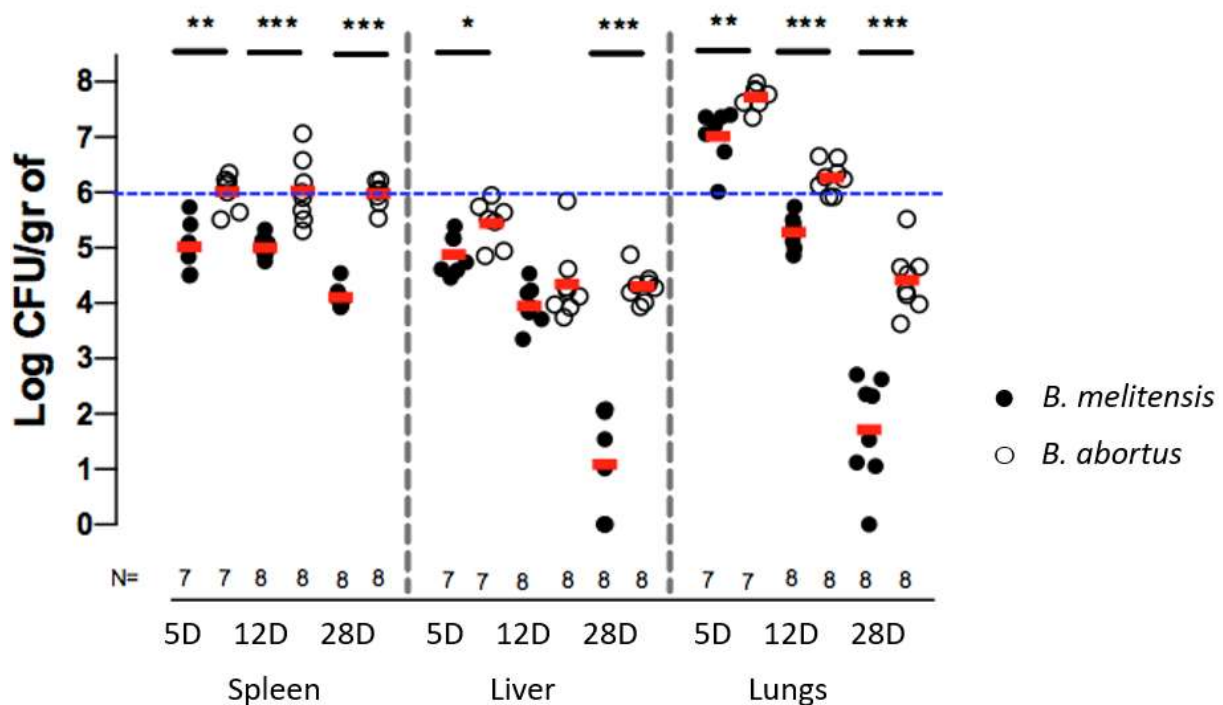


Figure 4: Analyse de la charge bactérienne de *Brucella* lors d’une infection par voie intranasale sur souris. Les souris sont infectées avec 5×10^6 CFU. La rate, le foie et les poumons sont récoltés 5, 12 et 28 jours après infection. Le taux de *B. abortus* est plus haut que celui de *B. melitensis* dans les organes. Dans la rate et le foie, il y a une faible diminution du taux de *B. melitensis* au fur et à mesure du temps. Dans les poumons, la charge de *B. melitensis* décroît rapidement. La quantité de *B. abortus* est stable dans la rate et diminue légèrement dans les poumons et le foie. Les résultats sont soumis au test statistique Mann-Whitney, un t-test non-paramétrique. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

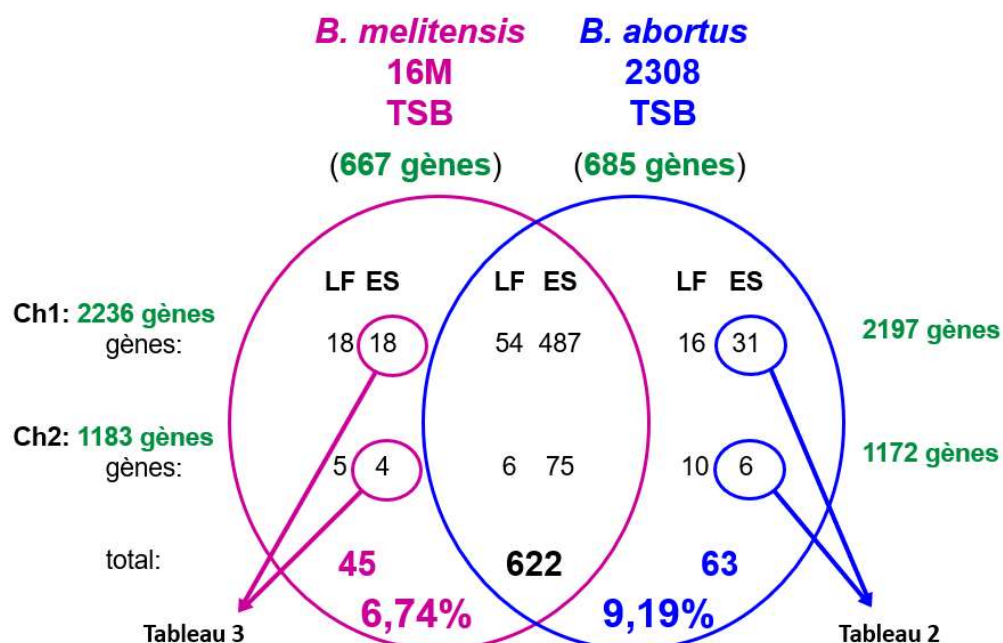


Figure 5: Analyse des gènes essentiels en milieu riche par Tn-seq. *B. melitensis* et *B. abortus* ont été étalés sur le milieu TSB agar. 622 gènes essentiels sont communs aux 2 espèces. *B. melitensis* a 45 gènes requis spécifiquement à sa croissance en TSB et *B. abortus* en a 63. Les valeurs indiquent le nombre de gènes identifiés par Tn-seq comme low fitness (LF) ou essentiel (ES).

RESULTATS

1. Comparaison de l'infection intranasale par *Brucella abortus* et *Brucella melitensis* chez les souris C57BL/6

Afin de déterminer la faisabilité du Tn-seq *in vivo*, la charge bactérienne contenue dans la rate, les poumons et le foie à différents temps post-infection est évaluée. Pour cela, des souris C57BL/6 ont été infectées par voie intranasale avec 5×10^6 CFU de *B. abortus* ou de *B. melitensis*. Les souris ont été sacrifiées à 5, 12 et 28 jours post infection et la rate, le foie et les poumons récoltés. La charge bactérienne a été estimée par étalement sur milieu Tryptic Soy Broth agar (TSB agar) pour *B. abortus* et sur milieu 2YT agar pour *B. melitensis*. Ces milieux sont les plus utilisés dans la littérature pour la culture de *Brucella*. Le TSB est le milieu optimal pour *B. abortus* et le 2YT pour *B. melitensis*.

Nos résultats (**Fig.4**) montrent qu'à 5 jours post-infection le nombre de bactéries dans les poumons, le foie et la rate de souris infectées par *B. abortus* est plus élevé que chez les souris infectées par *B. melitensis*. La quantité de *B. abortus* reste stable à 10^6 CFU/gr dans la rate entre 5 et 28 jours. Elle diminue progressivement au cours du temps dans les poumons et le foie mais reste supérieur à 10^4 CFU/gr. En contraste, le nombre de *B. melitensis* chute fortement dans les organes entre 5 et 28 jours post infection. Dans le foie et les poumons, il n'est plus que de $10-10^2$ CFU à 28 jours.

Nous pouvons donc conclure que *B. abortus* est plus virulente que *B. melitensis* chez les souris C57BL/6 infectées par voie intranasale. Nous confirmons donc les résultats publiés par Machelart *et al.* (2018)

2. Comparaison des gènes essentiels à la multiplication en milieu riche de *Brucella abortus* et *Brucella melitensis*

Dans un premier temps, afin de tenter de mieux comprendre les différences observées chez la souris entre *B. abortus* et *B. melitensis*, nous avons comparé par Tn-seq les gènes essentiels à la croissance de *B. abortus* en milieu Tryptic Soy Broth agar (TSB agar) et de *B. melitensis* en milieu TSB et en milieu 2YT agar.

Nous observons 26 gènes *low fitness* et 37 gènes essentiels requis spécifiquement à la croissance de *B. abortus* en TSB. 23 gènes estimés *low fitness* et 22 gènes essentiels sont nécessaires en particulier à la croissance de *B. melitensis* en TSB. 622 gènes essentiels et *low fitness* sont communs aux deux espèces. (**Fig.5**)

Parmi ceux-ci, nous retrouvons des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN tels que *parA* et *parB*, d'autres impliqués dans le cycle de Krebs comme *mdh*, *sucA* et *sucB* et certains requis également pour la synthèse d'acides aminés.

Des tableaux comparatifs reprenant les gènes essentiels spécifiques à *B. abortus* et à *B. melitensis* sur milieu TSB ont été réalisés. (**Tables 2 et 3**)

Table 2 : Tableau comparatif des gènes essentiels à *B. abortus* et non à *B. melitensis* sur milieu TSB agar

0	-0,5	-1	-1,5	-2	-2,5	-3	
			Mean:	Mean:			
			3,4	3,4			
			TSB	TSB			
ORF B. abortus 2308	ORF B. melitensis 16M	Gene name	2308 abortus	16M melitensis	function		
Transcriptional regulation							
BAB1_0882	BMEI1103		0,931	3,13	transcriptional regulator		
BAB1_0887	BMEI1098		1,516	3,294	transcriptional regulator		
Protein processing							
BAB1_1416	BMEI0610	hflK	1,457	3,54	Protein processing		
BAB1_1914	BMEI0149	trmD	1,1	2,96	RNA processing		
Transporter							
BAB2_1079	BMEI10178		1,127	3,379	transporter		
BAB2_1080	BMEI10177		1,768	3,345	transporter		
BAB2_1081	BMEI10176		1,209	3,316	transporter		
Metabolism							
BAB2_0098	BMEI11133	ldc	0,993	3,216	polyamine synthesis		
BAB1_2036	BMEI0036		1,066	3,124	Cobalamin synthesis VitB12		
BAB1_1761	BMEI0292	pykM	1,123	3,11	metabolism carbon		
BAB2_0070	BMEI10023	galU	0,961	3,08	metabolism carbon		
BAB2_0443	BMEI10496		1,665	2,853	lipid metabolism		
BAB2_0444	BMEI10497	fadJ	1,66	3,07	lipid metabolism		
Amino acid synthesis							
BAB1_0188	BMEI1759	Meth	1,496	3,329	amino acid synthesis		
BAB1_1408	BMEI0617	ilvB	1,845	2,942	amino acid synthesis		
Electron transport chain							
BAB1_1030	BMEI0972	gor	0,888	3,226	electron transfer		
BAB2_0727	BMEI10759	cydB	1,655	3,289	electron transport chain		
BAB2_0728	BMEI10760	cydA	1,483	3,247	electron transport chain		
Unknown							
BAB1_0817	BMEI1161		1,39	3,349	unknown		
BAB1_0993	N/A		1,761	-	unknown		
BAB1_1261	N/A		0,337	-	Unknown		
Other							
BAB1_0024	BMEI1916	cmk	1,052	3,145	homeostasis Ca2+		

Table 3 : Tableau comparatif des gènes essentiels à *B. melitensis* et non à *B. abortus* sur milieu TSB agar

0	-0,5	-1	-1,5	-2	-2,5	-3
			Mean:	Mean:		
			3,4	3,4		
			TSB	TSB		
ORF B. melitensis 16M	ORF B. abortus 2308	Gene name	16M melitensis	2308 abortus	function	
Cell division						
BMEII0925	BAB2_0882	minE	1,398	3,151	Cell division	
Transporter						
BMEIO053	BAB1_2019	cadA1	1,9	3,317	Transporter	
BMEIO450	N/A		1,442	N/A	Transporter	
BMEII0783	BAB2_0754	agcS	0,872	3,026	Transporter	
Amino acid synthesis						
BMEIO725	BAB1_1293		0,817	3,303	amino acid synthesis	
BMEII0509	BAB2_0456	proC	1,48	3,442	amino acid synthesis	
Metabolism						
BMEIO231	BAB1_1827	gdhZ	0,647	3,315	metabolim carbon	
BMEIO857	BAB1_1149	lpdA	1,746	3,346	metabolim carbon	
BMEIO974	N/A	RpiA	1,582	N/A	metabolim carbon	
BMEII0523	BAB2_0471	glnA	0,804	3,339	metabolism nitrogen	
Transcription						
BMEIO378	BAB1_1665	rpoH2	1,004	2,915	Transcription	
BMEI2036	BAB1_2092	bvrR	0,558	3,046	Transcription	
Protein processing						
BMEIO087	BAB1_1981	tlpA	1,829	2,577	chaperone	
Other						
BMEIO145	BAB1_1918	lpdA	0,607	2,706	flavoprotein enzyme	
					Low pH- induced protein A	
BMEIO678	BAB1_1346		1,873	2,782		
BMEI1894	BAB1_0046		1,404	3,12	antibiotic synthesis	
Unknown						
BMEIO376	BAB1_1667		1,876	2,749	unknow	
BMEIO373	BAB1_1668		1,071	3,158	Unknown	
BMEIO545	BAB1_1485		1,491	2,593	Unknown	
BMEIO567	N/A		0,906	N/A	Unknown	
BMEI1854	N/A		0,716	N/A	Unknown	
BMEI1895	BAB1_0045		1,62	3,239	Unknown	

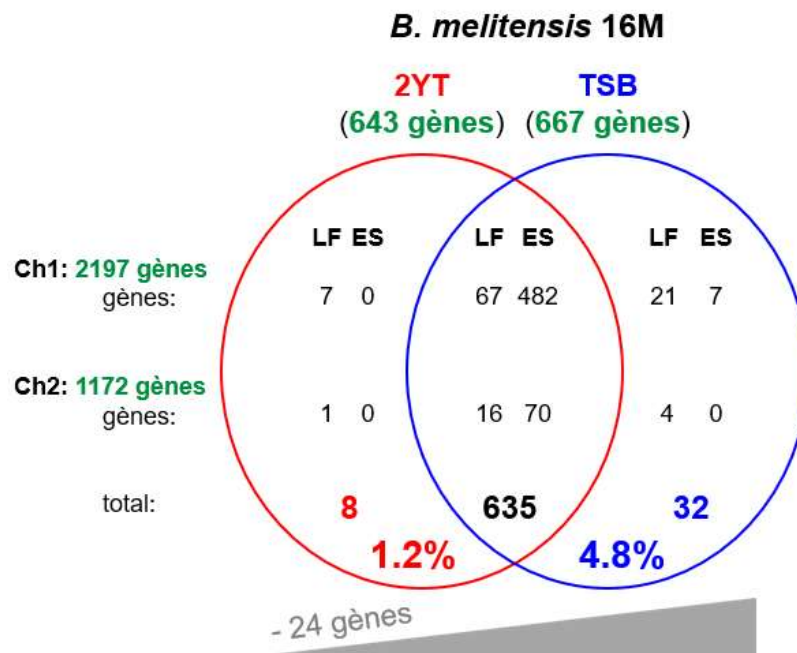


Figure 6: Analyse des gènes nécessaires pour la croissance de *B. melitensis* sur 2YT agar et TSB agar. *B. melitensis* a été étalée sur les milieux 2YT agar et TSB agar. 635 gènes essentiels et *low fitness* sont communs aux 2 milieux. On retrouve 32 gènes essentiels et *low fitness* spécifiques à la croissance en TSB agar. Les valeurs indiquent le nombre de gènes identifiés par Tn-seq comme *low fitness* (LF) ou essentiel (ES).

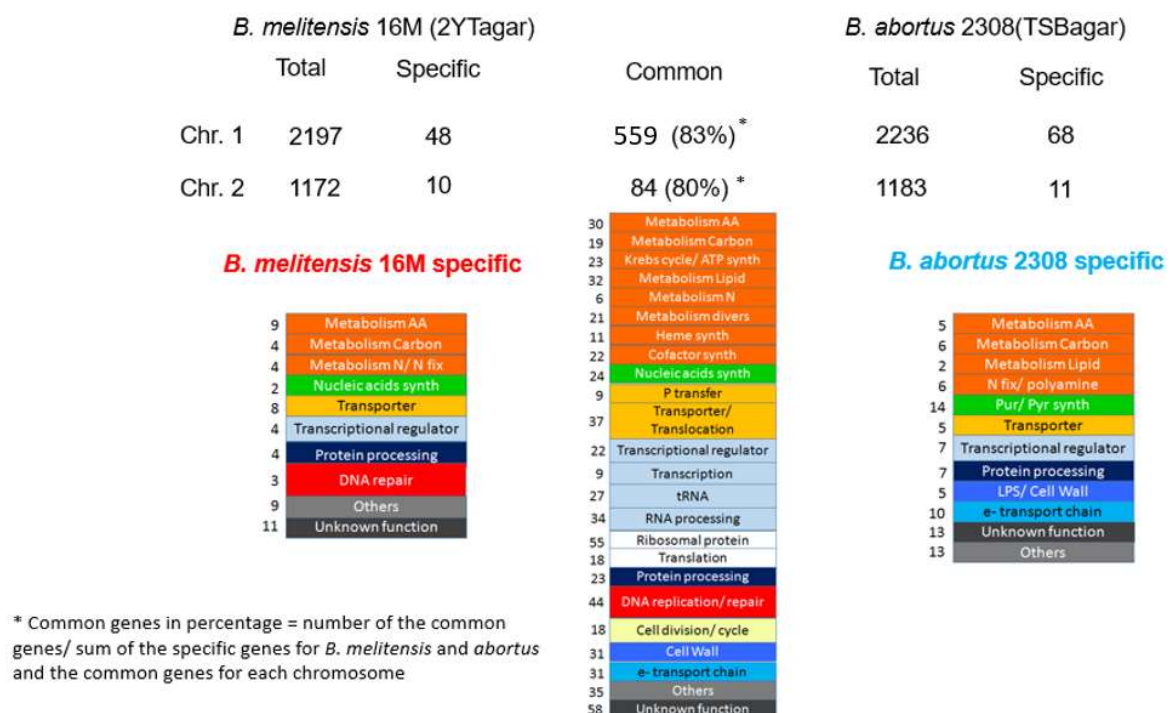


Figure 7: Analyse des gènes essentiels en milieu riche par Tn-seq. *B. melitensis* a été étalée sur le milieu 2YT agar et *B. abortus* sur le milieu TSB agar. 559 gènes essentiels dans le chromosome 1 et 84 gènes dans le chromosome 2 sont communs aux 2 espèces. *B. melitensis* a 58 gènes essentiels et *B. abortus* a 79 gènes essentiels qui leur sont spécifiques.

Le 2YT étant considéré comme le milieu optimal pour la croissance de *B. melitensis*, nous avons également comparé les gènes essentiels à *B. melitensis* en 2YT et en TSB. Nous pouvons observer 83 gènes *low fitness* et 552 gènes essentiels nécessaires à la croissance de *B. melitensis* en 2YT et TSB. 8 gènes *low fitness* sont particulièrement requis à la croissance de *B. melitensis* en 2YT. Tandis que 25 gènes *low fitness* et 7 gènes essentiels sont requis spécifiquement à la croissance de *B. melitensis* en TSB. En résumé, 635 gènes sont essentiels à la fois en 2YT et en TSB. Mais 8 gènes sont requis en particulier en 2YT et 32 en TSB. **(Fig.6)**

Entre ces deux conditions, on observe une différence de 24 gènes. Parmi ces 24 gènes supplémentaires requis spécifiquement à la croissance de *B. melitensis* en TSB, on a identifié des gènes impliqués dans le *processing* des protéines et dans la biosynthèse des purines comme *purC*, *purQ*, *purM*, *purF* et *purD*. Cela suggère que l'apport de purines est important pour la croissance et la survie en TSB de *B. melitensis*. Cela nous amène à nous questionner sur la composition des milieux. La quantité de purines contenue dans le TSB serait peut-être plus faible que dans le 2YT, ce qui expliquerait l'importance de la voie de synthèse des purines pour *Brucella* dans le milieu TSB.

Si l'on compare les gènes essentiels requis en milieu riche respectif pour chacune des espèces, nous observons que 559 gènes sont requis par Tn-seq sont communs à *B. melitensis* et *B. abortus* dans le chromosome 1 et 84 dans le chromosome 2. Les catégories contenant le plus de gènes essentiels sont celles concernant le métabolisme des acides aminés (30 gènes), le cycle de Krebs (23 gènes), les transporteurs (37 gènes), la chaîne de transport des électrons (31 gènes) et la réplication/réparation de l'ADN (44 gènes). De plus, 58 autres gènes sont uniquement essentiels pour *B. melitensis*. Parmi ces gènes, certains codent pour des transporteurs de zinc et de cobalt, pour des régulateurs transcriptionnels et d'autres sont impliqués dans le métabolisme de l'azote et des acides aminés. *B. abortus* a 79 gènes essentiels qui lui sont spécifiques dont certains codent pour des transporteurs de zinc ou sont impliqués dans le métabolisme des lipides. **(Fig.7)**

Nous avons identifié spécifiquement chez *B. abortus* des gènes impliqués dans la chaîne de transport des électrons comme *cytB/C1*, *cytC oxydase* et également des gènes requis à la synthèse du glutathion. De plus, des gènes codant pour la synthèse des pyrimidines, par exemple *pyrB*, *pyrC2* et *pyrF*, et la synthèse des purines sont également requis par *B. abortus* pour croître en milieu riche. Chez *B. melitensis* des gènes codant pour la synthèse de l'histidine et la réparation de l'ADN comme *recF*, *recO* et *recR* qui sont essentiels pour la croissance en milieu riche. **(Fig.8)**

B. melitensis 16M specific

B. abortus 2308 specific

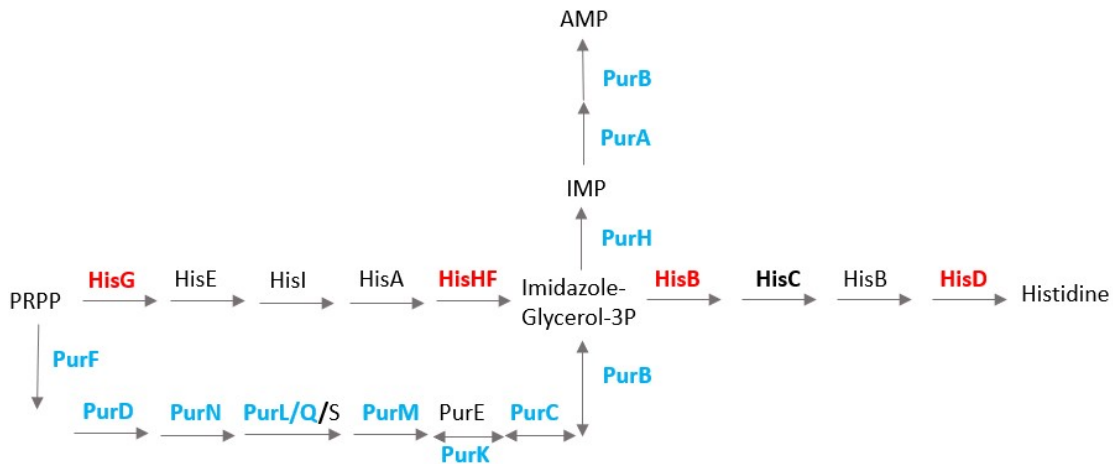


Figure 8: Gènes nécessaires à la synthèse de l’histidine et des purines en milieu riche. Ces gènes ont été découverts grâce à l’analyse Tn-seq. Presque tous les gènes de la voie de synthèse des purines sont essentiels pour *B. abortus* (en bleu). Quelques gènes sont essentiels dans la synthèse de l’histidine pour *B. melitensis* (en rouge). *hisC* est le seul gène de la voie de synthèse de l’histidine qui est nécessaire aux 2 espèces.

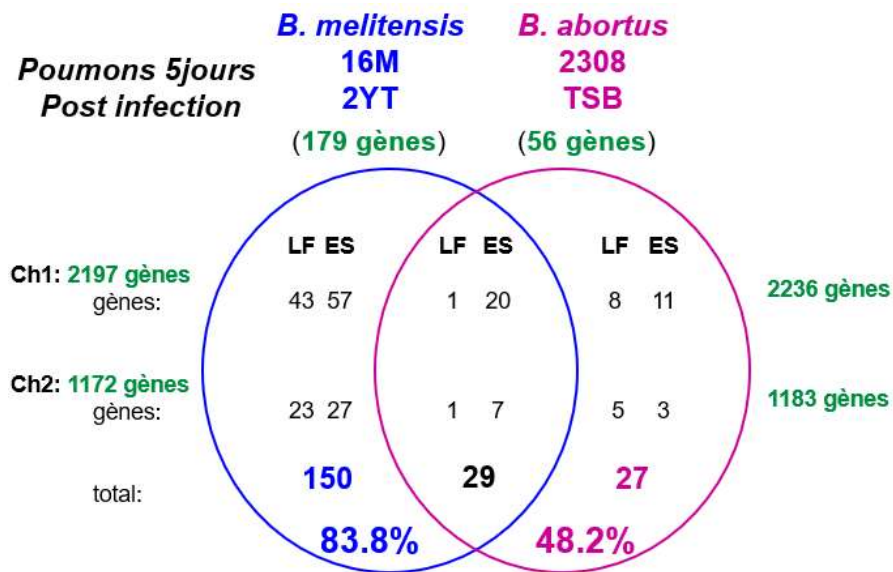


Figure 9: Analyse des gènes essentiels de *B. melitensis* et *B. abortus* dans les poumons 5 jours post-infection. Les souris ont été infectées par voie intranasale avec 5.10^6 CFU de la banque de mutants de *B. melitensis* ou *B. abortus*. L’analyse Tn-seq a été réalisée sur les poumons infectés pendant 5 jours. Les valeurs indiquent le nombre de gènes identifiés par Tn-seq comme *low fitness* (LF) ou essentiel (ES). Le nombre de gènes essentiels et *low fitness* chez *B. melitensis* est plus important que celui de *B. abortus*. L’analyse a été réalisée avec le programme informatique Artemis en utilisant comme paramètre un R100.

3. Comparaison des gènes essentiels à la multiplication dans le poumon de souris infectées de *Brucella abortus* et *Brucella melitensis*

B. abortus et *B. melitensis* présentent de fortes ressemblances génomiques. Cependant, leur différence de virulence, de cinétique et d'hôte préférentiel démontrent qu'elles sont bien différentes. Afin de comprendre les exigences métaboliques et les mécanismes d'échappement au système immunitaire spécifiques à chacune des espèces, un Tn-seq *in vivo* a été réalisé avec *B. abortus*. La banque de mutants obtenus par insertion du Tn5 dans le génome de *B. abortus* a été utilisée pour infecter les souris C57BL/6 par voie intranasale avec une dose de 5.10^6 CFU. Les poumons ont été récoltés 5 jours après l'infection, broyés et étalés sur milieu riche TSB. Les résultats de l'analyse Tn-seq ont été comparés à la liste des gènes identifiés comme essentiel à *B. abortus* en milieu TSB. De cette comparaison, nous avons établi la liste des gènes spécifiquement essentiels à la croissance de *B. abortus* dans le poumon à 5 jours. Nous avons ensuite comparé cette liste avec la liste déjà disponible (thèse de Georges Potemberg) des gènes spécifiquement essentiels à la croissance de *B. melitensis* dans les poumons à 5 jours.

Nous observons que 29 gènes requis à la croissance et à la survie dans les poumons pendant les 5 premiers jours de l'infection, sont communs aux deux espèces. En plus de ceux-ci, *B. melitensis* a 150 gènes considérés comme *low fitness* et essentiels qui lui sont spécifiques. Tandis que 27 gènes sont nécessaires uniquement à *B. abortus*. (**Fig.9**)

Des tableaux comparatifs reprenant les gènes essentiels pour *B. melitensis* et *B. abortus* 5 jours post-infection dans les poumons ont été réalisés. (**Tables 4 et 5**)

Le nombre de gènes requis pour *B. melitensis* est beaucoup plus important que celui pour *B. abortus* à 5 jours post-infection. Ce qui suggère que *B. melitensis* fait face à une pression de sélection plus importante dans les poumons que *B. abortus* ou *B. melitensis* serait plus sensible aux agressions de l'hôte, un résultat en accord avec le fait que *B. melitensis* soit plus rapidement éliminé dans les poumons que *B. abortus*. A la différence de *B. abortus*, on remarque que de nombreux gènes codant pour le système de sécrétion de types IV et des gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés sont requis pour la croissance de *B. melitensis* dans les poumons dès les 5 premiers jours de l'infection. Chez *B. abortus*, des gènes essentiels impliqués dans la synthèse des pyrimidines, dans la chaîne de transport des électrons et quelques gènes impliqués dans la synthèse de l'enveloppe sont essentiels. Globalement, nos résultats suggèrent donc que les deux espèces de *Brucella* ont des nécessités métaboliques et des stratégies d'échappement au système immunitaire différentes.

Table 4 : Tableau comparatif des gènes essentiels à *B. abortus* et non-essentiels à *B. melitensis* 5 jours post-infection dans les poumons

0	-0,5	-1	-1,5	-2	-2,5	-3
ORF B. melitensis 16M 2307	ORF B. abortus 2308	Gene name	B. melitensi s 5D PI	B. abortus 5D PI	function	
Cell envelope						
BMEII0848	BAB1_0545	gmd	3,034	0,918	envelope	
BMEII0835	BAB1_0553	wbkA	2,844	0,994	LPS	
BMEI1602	BAB1_0351	wadB	3,481	1,405	LPS	
Electron transport chain						
BMEII0759	BAB2_0727	cydB	3,043	0,467	electron transport chain	
BMEII0760	BAB2_0728	cydA	2,994	0,308	electron transport chain	
Transporter						
BMEII0761	BAB2_0729	cydC	3,275	0,452	transporter	
BMEII0762	BAB2_0730	cydD	2,919	0,31	transporter	
Pyrimidine metabolism						
BMEI1999	BAB1_2132	pyrF	2,701	0,418	Pyrimidine metabolism	
BMEI1644	BAB1_0688	pyrC-1	2,998	0,361	Pyrimidine metabolism	
BMEII0669	BAB2_0640	pyrC-2	2,657	0,292	Pyrimidine metabolism	
BMEII0670	BAB2_0641	pyrB	2,809	0,493	Pyrimidine metabolism	
BMEI1611	BAB1_0341	pyrD	2,417	0,587	Pyrimidine metabolism	
Amino acid synthesis						
BMEI0617	BAB1_1408	ilvB	3,051	0,511	amino acid synthesis	
RNA processing						
BMEI0571	BAB1_1458	mraW	2,312	1,231	RNA processing	
Other						
BMEII0758	BAB2_0726	ybgT	3,055	1,86	oxidation-reduction process	
BMEII0589	BAB2_0545	ribH-2	3,25	1,109	Vitamin B12 synthesis	

Table 5 : Tableau comparatif des gènes essentiels chez *B. melitensis* 5 jours post-infection dans les poumons

	0	-0,5	-1	-1,5	-2	-2,5	-3
ORF B. melitensis 16M	ORF B. abortus 2308	Gene name	B. melitensis 5D PI	B. abortus 5D PI	function		
Type IV secretion system							
BMEI10025	BAB2_0068	virB1	0,24028125	2,905	Type IV secretion system		
BMEI10026	BAB2_0067	virB2	0,22171875	2,991	Type IV secretion system		
BMEI10027	BAB2_0066	virB3	0,30009375	2,697	Type IV secretion system		
BMEI10028	BAB2_0065	virB4	0,222275	2,858	Type IV secretion system		
BMEI10029	BAB2_0064	virB5	0,222275	3,015	Type IV secretion system		
BMEI10030	BAB2_0063	virB6	0,193875	2,892	Type IV secretion system		
BMEI10031	BAB2_0062	virB7	0,59915625	3,075	Type IV secretion system		
BMEI10032	BAB2_0061	virB8	0,3155625	2,991	Type IV secretion system		
BMEI10033	BAB2_0060	virB9	0,25884375	2,935	Type IV secretion system		
BMEI10034	BAB2_0059	virB10	0,2866875	2,98	Type IV secretion system		
BMEI10035	BAB2_0058	virB11	0,28771875	2,776	Type IV secretion system		
BMEI10681	BAB2_0654	VirJ	1,94184375	2,929	Type IV secretion system		
Amino acid synthesis							
BMEI0449	BAB1_1586	trpE	1,94225	2,896	amino acid synthesis		
BMEI0844	BAB1_1163	TrpD	1,4248125	2,621	amino acid synthesis		
BMEI2017	BAB1_2113	trpF	1,731875	2,781	amino acid synthesis		
BMEI2018	BAB1_2112	trpB	1,8923125	2,899	amino acid synthesis		
Purine synthesis							
BMEI0296	BAB1_1667	PurE	1,043764706	3,004	purine synthesis		
BMEI1123	BAB1_0861	purS	1,617882353	2,097	purine synthesis		
Cell envelope							
BMEI1394	N/A	ManA	1,148235294	N/A	envelope		
BMEI2025	BAB1_2103	ManCcore	2,117647059	2,258	envelope		
Transcriptional regulation							
BMEI0510	BAB1_1521	Lrp	1,113411765	2,791	transcriptional regulator		
BMEI0978	BAB1_1024	glnB	0,542117647	2,297	transcriptional regulator		
BMEI1093	BAB2_0143	deoR1	0,317090909	2,586	transcriptional regulator		
Transporter							
BMEI0622	BAB1_1402	kup	1,309176471	3,018	transporter		
BMEI1843	BAB1_0102		2,034823529	3,519	transporter		
BMEI10337	BAB2_0274	metN	1,057939394	3,179	transporter		
Metabolism							
BMEI1436	BAB1_0525	PpdK	0,226823529	3,438	metabolism carbon		
BMEI1952	BAB1_2178	GyaR	0,656941176	2,31	metabolism carbon		
BMEI10384	BAB2_0323	glmS nag B	0,746666667	2,937	metabolism carbon		
BMEI10385	BAB2_0324	nagA	0,796121212	3	metabolism carbon		
BMEI10514	BAB2_0461	FabG	1,92	3,308	metabolism carbon		
Unknown							
BMEI0193	BAB1_1870		1,174588235	2,08	unknown		
BMEI0415	BAB1_1623	Asma	1,340235294	3,084	unknown		
BMEI0732	BAB1_1283		1,120941176	2,852	unknown		

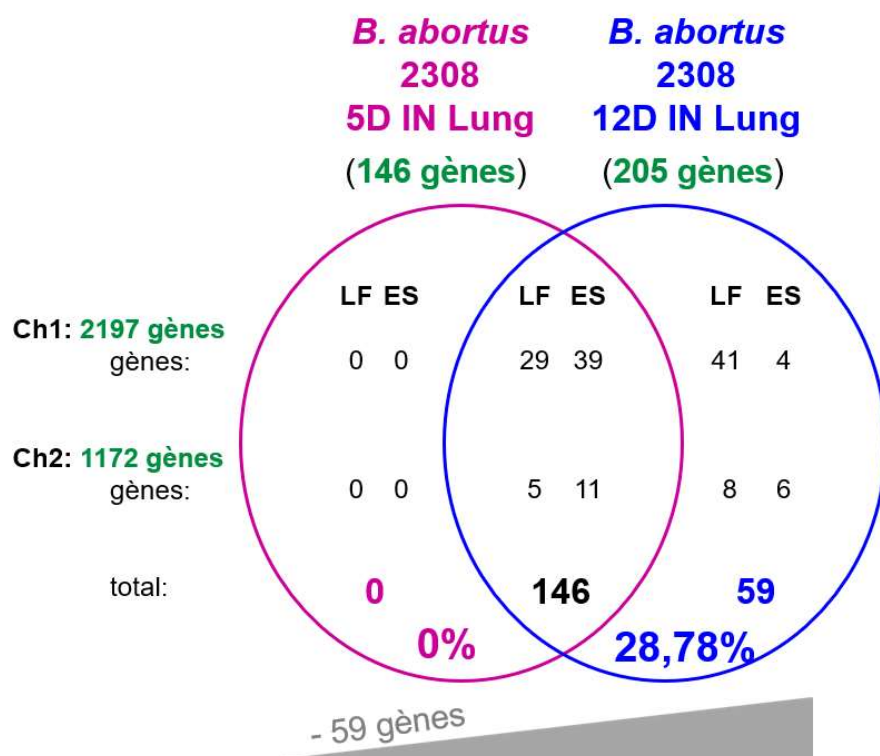


Figure 10: Analyse des gènes essentiels de *B. abortus* dans les poumons 5 et 12 jours post-infection. Les souris ont été infectées par voie intranasale avec 5.10^6 CFU de la banque de mutants de *B. abortus*. L'analyse Tn-seq a été réalisée sur les poumons infectés pendant 5 et 12 jours. Les valeurs indiquent le nombre de gènes identifiés par Tn-seq comme *low fitness* (LF) ou essentiel (ES). Le nombre de gènes essentiels et *low fitness* lors des 12 jours après l'infection est plus important que celui lors des 5 jours post-infection. L'analyse a été réalisé avec le programme informatique Artemis en utilisant comme paramètre un R100.

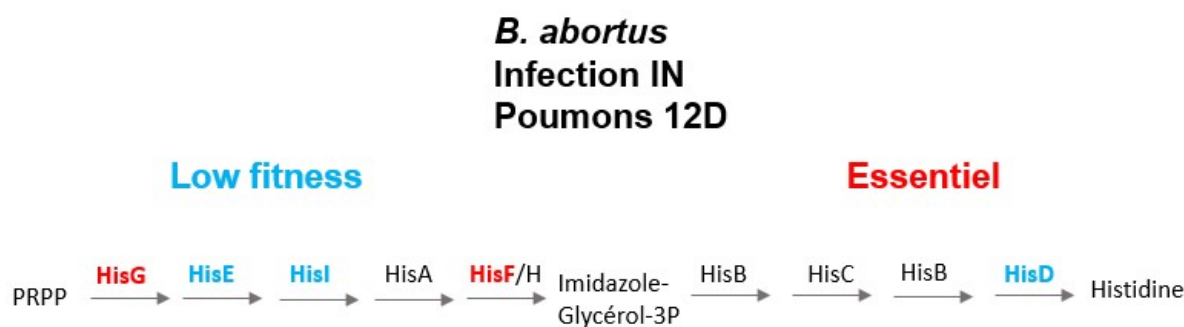


Figure 11: Gènes *low fitness* et essentiels pour *B. abortus* impliqués dans la voie de synthèse de l'histidine dans les poumons 12 jours post-infection. Lors de l'analyse Tn-seq, certains gènes de la voie de synthèse à l'histidine sont définis comme *low fitness* (en bleu) et essentiels (en rouge).

4. Comparaison des gènes essentiels à 5 et 12 jours dans le poumon de souris infectées par *Brucella abortus*

Une étude précédente réalisée par notre groupe a démontré que la nature des réponses immunes contrôlant la multiplication de *B. melitensis* suite à une infection intranasale, est très différente entre ces 2 temps. (Hanot Mambres et al, 2016). La réponse immune précoce est principalement dépendante de l'IL-17RA alors que la réponse tardive requiert l'IFN γ R.

En vue d'identifier les gènes indispensables à la persistance de *B. abortus* dans le poumon des souris infectées, nous avons réalisé un Tn-Seq à 12 jours post-infection. Dans un premier temps, la réponse immunitaire Th17 intervient pour lutter contre la réplication de *Brucella*. Ensuite, un changement de réponse immunitaire a lieu. Une réponse Th1, plus efficace que la Th17, est mise en place. Grâce à l'analyse des gènes essentiels à 5 jours post-infection, nous pouvons déterminer quels gènes sont requis pour survivre à la réponse Th17 du système immunitaire. Tandis que l'analyse des gènes essentiels à 12 jours post-infection, nous permet de caractériser les gènes requis à la persistance de *Brucella abortus* face à la réponse Th1.

Comme lors du précédent Tn-seq, la banque de mutants obtenue par insertion du Tn5 dans le génome de *B. abortus* est utilisée pour infecter les souris par voie intranasale avec une dose de 5.10^6 CFU. Les poumons ont été récoltés à 12 jours après l'infection, broyés et étalés sur milieu TSB agar. Cette expérience a été réalisée une fois. Il sera nécessaire de la reproduire pour confirmer nos analyses.

Si nous comparons les gènes identifiés par Tn-Seq à 5 et 12 jours post infection, nous pouvons voir que le nombre de gènes *low fitness* et essentiels augmente de manière importante au cours du temps. 59 gènes *low fitness* et essentiels sont uniquement requis au temps tardif 12 jours. **(Fig.10)**

Le système de sécrétion de type IV n'est pas indispensable dans les poumons 5 jours post-infection alors qu'il l'est après 12 jours. De même, plusieurs gènes impliqués dans la synthèse de l'enveloppe, *AmiC*, *MurI*, *Omp19* et *Omp10*, sont non-essentiels ou *low fitness* dans les poumons 5 jours post-infection et deviennent essentiels à 12 jours post-infection. Nous observons le même phénomène pour 4 gènes impliqués dans la modification et dégradation des protéines et 6 transporteurs. **(Table 6)**

On observe aussi des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'histidine qui sont essentiels et *low fitness* 12 jours après l'infection uniquement. **(Fig.11 et table en annexe)**

Ces résultats suggèrent que la réponse tardive du système immunitaire soumet *Brucella* à une pression de sélection qui augmente avec le temps.

Table 6 : Tableau comparatif des gènes essentiels à *B. abortus* à 5 et 12 jours post-infection dans les poumons

		0,5	0	-0,5	-1	-1,5	-2	-2,5	-3		
			ORF <i>B. abortus</i>	Gene name	CTRL TSB	5D IN Lung	12D IN Lung	Fonction			
M	Chr1				3,4	3,4	3,2				
	Chr2				3,4	3,4	3,3				
SD	Chr1				0,4056311	0,1310385	0,533784				
	Chr2				0,3280115	0,1355321	0,4521435				
total gènes	Chr1					65	106				
	Chr2					21	35				
Type IV secretion system											
			BAB2_0058	VirB11	3,322	2,776	1,3569051	type IV secretion system			
			BAB2_0059	VirB10	3,493	2,98	1,4249049	type IV secretion system			
			BAB2_0060	VirB9	3,417	2,935	1,4918744	type IV secretion system			
			BAB2_0061	VirB8	3,44	2,994	1,380602	type IV secretion system			
			BAB2_0062	VirB7	3,4	3,075	1,4568442	type IV secretion system			
			BAB2_0063	VirB6	3,484	2,892	1,4722987	type IV secretion system			
			BAB2_0064	VirB5	3,471	3,015	1,1786632	type IV secretion system			
			BAB2_0065	VirB4	3,364	2,858	1,1590875	type IV secretion system			
			BAB2_0066	VirB3	3,19	2,697	1,1869056	type IV secretion system			
			BAB2_0067	VirB2	3,495	2,991	1,4990865	type IV secretion system			
			BAB2_0068	VirB1	3,371	2,905	1,4279958	type IV secretion system			
Amino acid synthesis											
			BAB1_2086	hisF	2,936	2,222	0,852125	histidine biosynthesis			
Protein processing											
			BAB1_1192	ClpS	3,016	2,257	1,0795	Protein modification and degradation			
			BAB1_1532	CspA	3,186	2,442	1,238875	Protein modification and degradation			
			BAB1_1846		2,415	1,965	0,7448125	Protein modification and degradation			
			BAB1_1866	PepM23	2,412	2,159	0,8319375	Protein modification and degradation			
Cell envelope											
			BAB1_0931	AmiC	2,326	1,903	0,801125	envelope			
			BAB1_1217	MurI	3,12	2,195	0,9934375	envelope			
			BAB1_1930	Omp19	3,571	2,856	1,45775	envelope			
			BAB2_0076	Omp10	2,548	2,393	1,3064204	envelope			
Transcriptional regulation											
			BAB1_0507	PdeA	2,362	1,905	0,8680625	Regulation transcription			
			BAB2_0118	VjbR	3,3	2,736	1,0550272	Regulation transcription			
Transporter											
			BAB1_0322		3,215	3,244	2,06125	Transporter			
			BAB1_0323	MexB	3,071	3,024	1,706375	Transporter			
			BAB1_1039		2,473	1,588	0,5355	Transporter			
			BAB1_1040		2,274	1,577	0,255	Transporter			
			BAB1_1041		2,536	1,951	0,53975	Transporter			
			BAB1_1692		3,213	2,534	1,19	Transporter			
Metabolism											
			BAB1_0113	FixR	2,926	2,96	1,9603125	Metabolism Carbon			
			BAB1_0318		3,056	2,378	1,034875	Metabolism Carbon			
			BAB1_0525	PpdK	3,28	3,438	2,0145	Metabolism Carbon			
			BAB2_0442		2,563	1,448	0,4049079	Metabolism			
Unknown											
			BAB1_0284		3,089	3,348	1,802	unknown			
			BAB1_1092		2,795	2,731	1,2569375	unknown			
			BAB1_1283		3,407	2,852	1,581	unknown			

5. Comparaison des gènes essentiels à 12 jours dans le poumon et la rate de souris infectées par *Brucella abortus*

Afin de déterminer si les gènes indispensables à la multiplication de *B. abortus* varient en fonction de l'organe analysé, nous avons également réalisé un Tn-seq sur rate. Afin d'éviter les effets de *bottleneck* pouvant résulter de la dissémination du poumon à la rate, nous avons réalisé l'infection par voie intrapéritonéale. Ainsi, une banque de mutants obtenue par insertion du Tn5 dans le génome de *B. abortus* est utilisée pour infecter les souris par voie intrapéritonéale avec une dose de 5.10^6 CFU. Les poumons et la rate ont été récoltés 12 jours après l'infection, broyés et étalés sur milieu TSB agar.

Une analyse comparative reprenant les gènes essentiels pour la croissance et dissémination de *B. abortus* 12 jours post-infection dans les poumons et la rate a été réalisée. (**Table 7**)

116 gènes requis à la croissance et à la survie de *B. abortus* pendant les 12 premiers jours de l'infection sont communs dans les poumons et la rate. *B. abortus* présente 25 gènes considérés comme *low fitness* et essentiels qui lui sont spécifiquement requis dans les poumons. Parmi ces gènes, de nombreux codent pour le système de sécrétion de type IV et d'autres sont impliqués dans la synthèse du LPS comme *WadB* et *ManB*. Tandis que 35 gènes *low fitness* et 4 gènes essentiels sont nécessaires spécifiquement pour la colonisation de la rate. (**Fig.12**)

On remarque que beaucoup plus de gènes sont essentiels dans les poumons que dans la rate, ce qui suggère que la pression de sélection sur *Brucella* y est plus réduite. Le système de sécrétion de type IV n'est pas indispensable dans la rate alors qu'il l'est dans le poumon, c'est un résultat majeur. De même, plusieurs gènes impliqués dans la synthèse du LPS passe d'essentiel dans le poumon à quasi *low fitness* dans la rate.

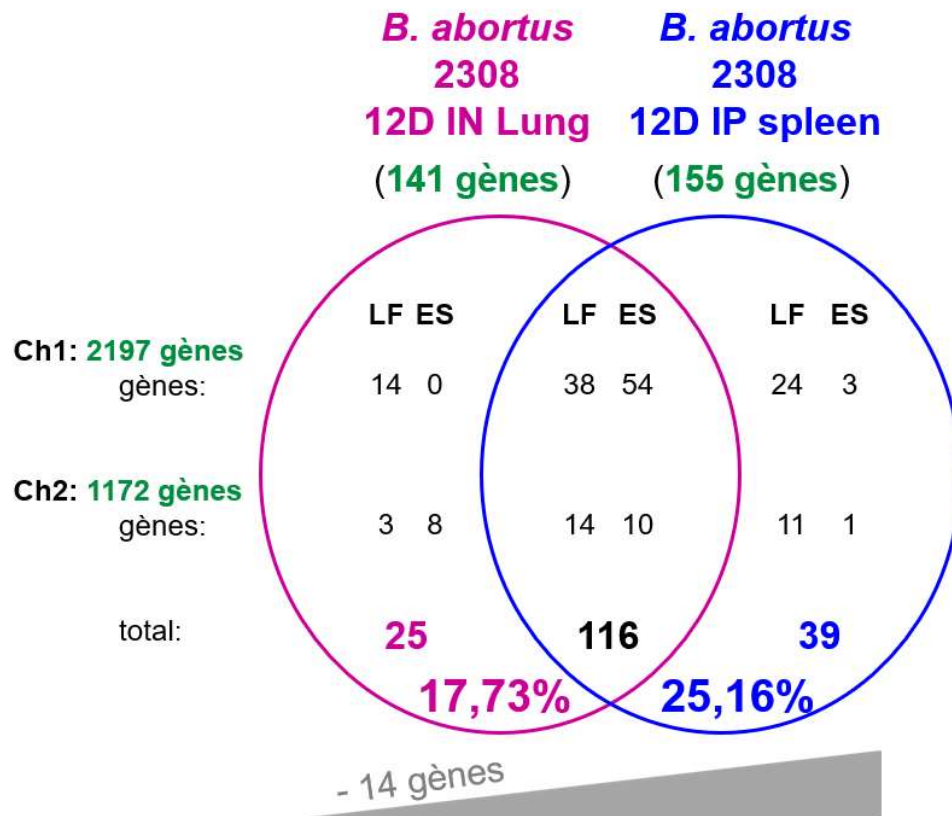


Figure 12: Analyse des gènes essentiels de *B. abortus* dans les poumons et la rate 12 jours post-infection. Les souris ont été infectées par voie intranasale avec 5.10^6 CFU de la banque de mutants de *B. abortus*. L'analyse Tn-seq a été réalisée sur les poumons et la rate infectés pendant 12 jours. Les valeurs indiquent le nombre de gènes identifiés par Tn-seq comme *low fitness* (LF) ou essentiel (ES). Le nombre de gènes essentiels et *low fitness* dans la rate est plus important que celui dans les poumons. Une différence de 14 gènes est observée. L'analyse a été réalisée avec le programme informatique Artemis en utilisant comme paramètre un R100.

Table 7 : Tableau comparatif des gènes essentiels à *B. abortus* 12 jours post-infection dans les poumons et la rate

		0,5	0	-0,5	-1	-1,5	-2	-2,5	-3				
		ORF B. abortus	Gene name	CTRL TSB	12D IN Lung	12D IP Spleen	Function						
M	Chr1				3,4	3,2	3,4						
	Chr2				3,4	3,3	3,4						
SD	Chr1			0,4056311	0,533784	0,1568485							
	Chr2			0,3280115	0,4521435	0,1588505							
total gènes	Chr1					106	119						
	Chr2					35	36						
Type IV secretion system													
		BAB2_0058	VirB11	3,322	1,35631	2,39	type IV secretion system						
		BAB2_0059	VirB10	3,433	1,4243	2,889	type IV secretion system						
		BAB2_0060	VirB9	3,417	1,49187	2,383	type IV secretion system						
		BAB2_0061	VirB8	3,44	1,3806	3,078	type IV secretion system						
		BAB2_0062	VirB7	3,4	1,45684	2,877	type IV secretion system						
		BAB2_0063	VirB6	3,484	1,4723	3,093	type IV secretion system						
		BAB2_0064	VirB5	3,471	1,17866	3,302	type IV secretion system						
		BAB2_0065	VirB4	3,364	1,15303	3,193	type IV secretion system						
		BAB2_0066	VirB3	3,19	1,18631	3,102	type IV secretion system						
		BAB2_0067	VirB2	3,495	1,49303	3,372	type IV secretion system						
		BAB2_0068	VirB1	3,371	1,428	3,408	type IV secretion system						
Amino acid synthesis													
		BAB1_0285	HisD	3,291	2,686	1,52	histidine biosynthesis						
		BAB1_1163	TrpD	3,272	1,78925	3,063	Tryptophan synthesis						
		BAB1_1586	TrpE	3,416	2,278	3,33	Tryptophan synthesis						
		BAB2_0043		2,535	2,22236	1,069	histidine biosynthesis						
Protein processing													
		BAB1_2025	DnaJ	2,396	2,07825	0,947	Protein modification and degradation						
Purine synthesis													
		BAB1_0861	PurS	2,599	1,28031	2,313	purine synthesis						
Cell envelope													
		BAB1_0069	BtsE	3,298	3,03344	1,841	adhésion						
		BAB1_0351	wadB	2,595	1,27288	2,308	LPS						
		BAB1_0534	WbkD	3,116	0,57306	1,875	LPS						
		BAB1_0535	WbkF	2,838	0,30434	1,864	LPS						
		BAB1_0542	Wst	2,454	0,19231	1,473	LPS						
		BAB1_0543	Wzm	2,183	0,26388	1,416	LPS						
		BAB1_0545	Gmd	3,349	0,30919	1,339	LPS						
		BAB1_0553	WbkA	3,044	0,38563	1,711	LPS						
		BAB1_0563	WbkE	3,322	0,61034	1,665	LPS						
		BAB1_0804		2,468	2,41719	0,775	envelope						
		BAB1_0999	WboA	3,109	0,17425	1,771	LPS						
		BAB1_1000	WbdA	2,944	0,323	1,391	LPS						
		BAB2_0099		2,77	2,31818	0,985	LPS synthesis						
		BAB2_0855	ManB	3,448	0,38636	2,562	LPS synthesis						
Transcriptional regulation													
		BAB1_1962	GntR13	2,788	2,97288	1,655	Regulation transcription						
		BAB1_1981	TlpA	2,577	2,16856	1,085	Regulation transcription						
Metabolism													
		BAB1_0113	FixR	2,926	1,96031	0,714	Metabolisme Carbone						
		BAB1_0318		3,056	1,03488	2,224	Metabolisme Carbone						
Other													
		BAB1_0172	rph	2,929	2,68069	1,69	ribonuclease						
		BAB1_1485	PncA	2,593	2,0655	0,863	Integral membrane protein						
		BAB1_1546		3,242	2,98775	1,735	polyphenol oxidase						
		BAB1_1553	YchF	2,359	2,38319	1,296	ribosomal protein						
		BAB1_2024		2,878	2,52663	0,807	inconnue						
		BAB2_0535	SodC	3,104	2,73236	1,684	riboflavine synthesis						
Unknown													
		BAB1_0070		3,075	3,60825	1,631	inconnue						
		BAB1_0088		3,452	3,60825	1,867	inconnue						
		BAB1_1947		2,775	2,99944	1,366	inconnue						

Discussion et perspectives

DISCUSSION

Le **premier objectif** de ce mémoire était de mettre en évidence les différences de virulence en *B. abortus* et *B. melitensis* chez les souris C57BL/6 après une infection intranasale ainsi que de déterminer la faisabilité d'une analyse Tn-seq sur *B. abortus*. Nous avons confirmé que *B. abortus* était plus virulent que *B. melitensis*. Il persiste à un plus haut niveau et plus longtemps dans le poumon et à un plus haut niveau dans la rate. Cette virulence plus élevée nous a permis de réaliser une analyse Tn-Seq à 12 jours post infection dans le poumon et la rate, ce qui n'est pas réalisable chez *B. melitensis*.

Notre **deuxième objectif** était, à l'aide de l'approche Tn-Seq, d'identifier les gènes indispensables à l'infection par *B. abortus in vivo* et de comparer ceux-ci aux gènes déjà identifiés chez *B. melitensis*, afin de mieux comprendre les différences observées chez la souris entre les deux espèces et de sélectionner des gènes candidats permettant le développement d'un vaccin vivant atténué contre *Brucella*.

Une comparaison des gènes *low fitness* et essentiels à *B. melitensis* et *B. abortus* dans le poumon à 5 jours suggère que *B. abortus* fait face à une pression de sélection moindre comparé à *B. melitensis*. Beaucoup moins de gènes semblent essentiels à *B. abortus* à 5 jours. Par exemple, les gènes de l'opéron codant pour le système de sécrétion de type IV ainsi que le gène *vjbR*, codant pour un régulateur transcriptionnel du système de sécrétion de type IV, sont essentiels pour *B. melitensis* à 5 jours et non pour *B. abortus*.

Ces gènes ne deviennent essentiels pour *B. abortus* qu'à 12 jours post infection. De plus, un Tn-seq réalisé sur la rate à 12 jours post-infection montre que ces mêmes gènes sont majoritairement non-essentiels dans cet organe. La rate est décrite de longue date comme l'un des principaux réservoirs de l'infection chez la souris, nos résultats suggèrent que la pression de sélection sur *Brucella* dans cet organe est plus faible que dans le poumon.

Hartigh et son équipe (2008) ont créé des mutants par délétion pour chaque élément de l'opéron *virB* de *B. abortus*. Ces mutants ont été testés *in vivo* sur modèle souris. Les résultats obtenus après 7 jours d'infection montrent que la mutation de certains éléments de cet opéron, diminue légèrement la virulence de *B. abortus*. Tandis que 8 semaines après infection, tous les mutants sauf un, sont fortement atténués dans la rate. Ces résultats concordent avec nos analyses Tn-seq qui définit certains gènes codant pour le système de sécrétion de type IV de *B. abortus* comme atténués dans la rate 12 jours post-infection.

Le système de sécrétion de type IV est considéré comme indispensable à *Brucella* pour échapper au phagolysosome. La capacité de *B. abortus* à se passer de ce système crucial pendant les étapes précoces de l'infection pose donc question. D'autres effecteurs peuvent-ils compenser l'opéron *virB* ? Nous savons que le système de sécrétion de type IV est nécessaire à *Brucella* pour rejoindre sa niche répliquative, le réticulum endoplasmique. Au vu de nos résultats, nous nous demandons alors si *B. abortus* ne résiderait pas dans une autre niche cellulaire que le réticulum endoplasmique ?

Table 8 : Tableau comparatif des gènes candidats sélectionnés chez *B. abortus*

		0,5	0	-0,5	-1	-1,5	-2	-2,5	-3
						CTRL TSB	5D IN Lung	12D IN Lung	12D IP Spleen
M	Chr1					3,4	3,4	3,2	3,4
	Chr2					3,4	3,4	3,3	3,4
SD	Chr1					0,405631	0,131038	0,533784	0,156848
	Chr2					0,328011	0,135532	0,452144	0,158851
Gene total	Chr1						65	106	119
	Chr2						21	35	36
				BAB1_1657	DsbB	2,48	1,444	0,742688	0,915
				BAB1_0804		2,468	2,723	2,417188	0,775
				BAB2_0099		2,77	2,882	2,318175	0,985
				BAB1_0113	fixR	2,926	2,96	1,960313	0,714
				BAB1_1984	lysA	2,038	0,344	0,256063	0,466

Test souche 2308 IN 5. 10⁶ 5D

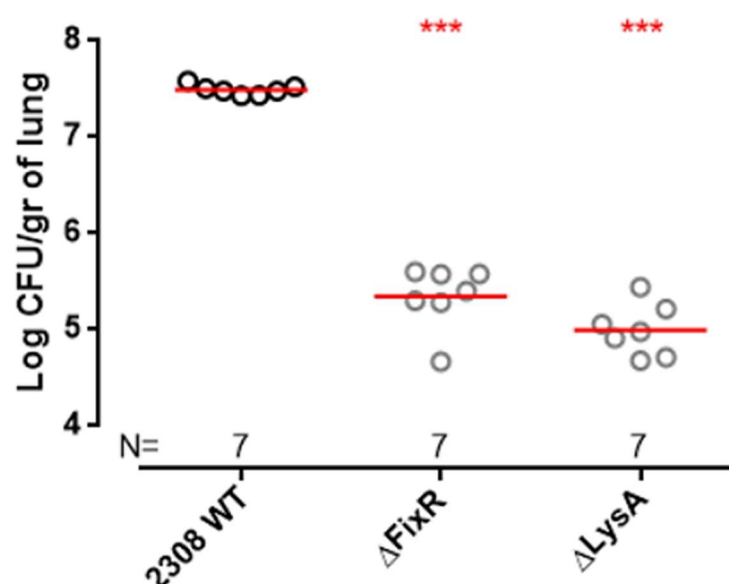


Figure 13 : Analyse de la charge bactérienne de *Brucella abortus* WT et des mutants de délétion pour *fixR* et *lysA* lors d'une infection par voie intranasale sur souris. Les souris sont infectées avec with 5×10^6 CFU. Les poumons sont récoltés 5 jours après infection. Les mutants délétés pour *FixR* et *LysA* sont significativement atténués dans les poumons. Les résultats sont soumis au test statistique Mann-Whitney, un t-test non-paramétrique. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Nous avons identifié le gène *wadB*, impliqués dans la synthèse du LPS, comme essentiel dans les poumons et non dans la rate. L'importance de ce gène a été étudié par Ramirez et son équipe (2014). Le mutant pour ce gène chez *B. abortus* a été testé en souris. Le mutant *wadB* n'est pas atténué en rate après deux semaines post-infection mais le devient uniquement à partir de 20 semaines post-infection.

L'article de Soler-Llorens et al (2014) présente des résultats identiques à ceux de Ramirez mais l'espèce utilisée est *B. ovis*. La protection grâce au vaccin vivant atténué avec le mutant *wadB* est statistiquement importante.

L'importance des gènes *wbkA* et *manB*, également impliqués dans la synthèse du LPS, chez *B. abortus* a été étudié par Monreal et al (2003) dans le modèle murin. Ils reportent que la virulence dans la rate des mutants de ces deux gènes n'est presque pas altérée après 5 jours.

Certains gènes impliqués dans la synthèse du tryptophane, tel que *trpD* et *trpE*, sont identifiés comme essentiels dans les poumons à 12 jours et non dans la rate 12 jours post-infection. La disponibilité de ce substrat semble donc être différente entre les poumons et la rate. Mais cette différence est-elle due à une différence de réponse immunitaire de l'hôte dans ces organes ?

Alcantara et al (2004), confirme nos résultats. En effet, un mutant codant pour la synthèse du tryptophane (*trpB*) a été testé *in vivo* sur souris. Leurs résultats démontrent que la virulence de ce mutant n'est pas altérée dans la rate.

L'article de Jelsbak et al (2014) a démontré que la voie de synthèse du tryptophane est aussi requis *in vivo* chez *Salmonella typhimurium*.

L'équipe de Smith et al (2001) ont mis en évidence l'essentialité de *trpD* chez *Mycobacterium tuberculosis* *in vivo*. L'efficacité de protection d'un vaccin vivant atténué avec une mutation du gène *trpD* chez *Mycobacterium tuberculosis* a été démontré.

L'ensemble de ces articles démontre que le tryptophane est un acide aminé essentiel *in vivo* pour de nombreuses bactéries.

Enfin, notre **troisième objectif** était de valider nos analyse Tn-Seq en construisant des mutants de délétion. Il est important de tester des mutants de délétion. En effet, ceux-ci peuvent différer des mutants dus à l'insertion d'un mini-Tn5 car cette insertion peut avoir des effets polaires sur le reste des gènes. Nous avons sélectionné des gènes candidats (**Table 8**) et construit plusieurs mutants de délétion. : *dksA* impliqué dans la répllication de l'ADN, *clpA* et *dsbB* qui sont des protéines chaperones, *BAB1_0804* joue un rôle dans la synthèse du LPS, *BAB2_0099* exporte les polysaccharides vers l'enveloppe, *fixR* impliqué dans la fixation de l'azote, *lysA* qui joue un rôle dans la synthèse des acides aminés. Il faut à présent, vérifier la virulence de ces mutants en souris. Malheureusement nous ne disposons pas encore des résultats du test de tous ces mutants chez la souris. Actuellement, seuls les mutants de *fixR* et *lysA* ont été testés en souris. 5 jours post-infection, on remarque une importante atténuation pour ces mutants, ce qui confirme nos analyses Tn-seq. (**Fig. 13**)

PERSPECTIVES

Nous prévoyons d'effectuer de nouvelles analyses Tn-seq sur *B. abortus* dans des conditions de déficience de la réponse immunitaire contre *Brucella*. En réalisant des analyses comparatives des gènes essentiels en condition souris wild type et des gènes requis en condition d'immunodéficience, nous espérons définir les gènes requis spécifiquement pour échapper à la réponse du système immunitaire.

Nous analyserons par Tn-seq les poumons de souris IL-17RA^{-/-} ou IFN- γ R^{-/-} infectées, respectivement, par voie intranasale et par voie intrapéritonéale avec *B. abortus*. Pour rappel, la réponse Th17 permet de contrôler l'infection pulmonaire à *Brucella* au temps précoce et la réponse Th1, l'infection de la rate (Hanot Mambres et al, 2016). Ces études pourraient nous permettre de caractériser les gènes requis spécifiquement pour la survie de *Brucella* face aux réponses immunes Th1 et Th17.

Il est bien démontré que l'infection du placenta par *Brucella* induit l'avortement chez le bétail et la souris (Tobias, Cordes et Schuring, 1993). Nous analyserons donc également par Tn-Seq le placenta de souris gestantes infectées par voie intrapéritonéale. Cela permettra de déterminer quels gènes sont essentiels à l'invasion du placenta par *Brucella*, ce qui nous aidera à développer un vaccin atténué incapable de coloniser celui-ci.

Enfin, les espèces de *Brucella* présentant une spécificité d'hôte, il serait intéressant dans une optique vaccinale de déterminer la base génétique de cette spécificité. Nous prévoyons donc également de réaliser une analyse Tn-seq de *Brucella* chez l'hôte naturel. Son but serait également de valider les gènes décrits comme essentiels en modèle murin. Nous souhaiterions donc infecter des moutons avec une banque de mutants transpositionnel de *B. melitensis* ou de *B. abortus*. Les résultats obtenus en modèle souris, mouton et bovin seront comparés.

Grâce à ces résultats, nous pourrions sélectionner les gènes qui sont essentiels uniquement aux temps tardifs dans les poumons et aux temps précoces dans la rate et le placenta. Ce qui permettrait de disposer de mutants capables de persister assez longtemps dans les muqueuses pour induire le développement d'une mémoire protectrice mais incapable de disséminer dans la rate et le placenta et donc, de causer un avortement. Si ces gènes sont également essentiels dans des conditions d'immunosuppression (IL-17RA^{-/-} et IFN- γ R^{-/-}), cela augmentera encore la sécurité du vaccin.

Pour satisfaire à l'ensemble de ces conditions, nous projetons de construire des doubles ou triples mutants pour s'assurer d'obtenir une souche vivante atténuée idéale pour créer un vaccin. Ces mutations peuvent atténuer la virulence de la souche. Il est donc important de choisir des combinaisons de mutations qui permettront à la souche vaccinale d'induire une immunité.

Bibliographie

- Abul Abbas Andrew H. Lichtman Shiv Pillai. (2015). Basic Immunology 5th Edition Functions and Disorders of the Immune System. *Elsevier*.
- Akçakuş, M., Esel, D., Cetin, N., Kisaarslan, A. P., & Kurtoğlu, S. (2005). Brucella melitensis in blood cultures of two newborns due to exchange transfusion. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 47(3), 272–274. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16250315>
- Alcantara, R. B., Read, R. D. A., Valderas, M. W., Brown, T. D., & Roop, R. M. (2004). Intact Purine Biosynthesis Pathways Are Required for Wild-Type Virulence of Brucella abortus 2308 in the BALB/c Mouse Model. *Infection and Immunity*, 72(8), 4911–4917. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.8.4911-4917.2004>
- Atluri, V. L., Xavier, M. N., de Jong, M. F., den Hartigh, A. B., & Tsolis, R. M. (2011). Interactions of the Human Pathogenic Brucella Species with Their Hosts. *Annual Review of Microbiology*, 65(1), 523–541. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102905>
- Aurore Demars, Aurore Lison, Arnaud Machelart, Margaux Van Vyve, G., Potemberg, Jean-Marie Vanderwinden, Xavier De Bolle, Jean-Jacques Letesson, E., & Muraille. (2019). Route of infection strongly impacts the host-pathogen relationship. *Frontiers in Immunology*.
- Barbier, T., Zúñiga-Ripa, A., Moussa, S., Plovier, H., Sternon, J. F., Lázaro-Antón, L., ... Letesson, J. J. (2018). Brucella central carbon metabolism: an update. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(2), 182–211. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1332002>
- Bellaire, B. H., Roop, R. M., & Cardelli, J. A. (2005). Opsonized Virulent Brucella abortus Replicates within Nonacidic, Endoplasmic Reticulum-Negative, LAMP-1-Positive Phagosomes in Human Monocytes. *Infection and Immunity*, 73(6), 3702–3713. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3702-3713.2005>
- Borsa, B., Aldag, M., Yilmaz, M., Dalar, Z., & Ozalp, V. (2016). Comparison of a Novel Test (ODAK Brucella Coombs Gel Test) with Commonly Used Serological Tests in Human Brucellosis. *Clinical Laboratory*, 62(09/2016). <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2016.160120>
- Caswell, C. C., Elhassanny, A. E. M., Planchin, E. E., Roux, C. M., Weeks-Gorospe, J. N., Ficht, T. A., ... Roop, R. M. (2013). Diverse Genetic Regulon of the Virulence-Associated Transcriptional Regulator MucR in Brucella abortus 2308. *Infection and Immunity*, 81(4), 1040–1051. <https://doi.org/10.1128/IAI.01097-12>
- Celli, J. (2019). The Intracellular Life Cycle of Brucella spp. *Microbiology Spectrum*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAI-0006-2019>
- Christen, B., Abeliuk, E., Collier, J. M., Kalogeraki, V. S., Passarelli, B., Collier, J. A., ... Shapiro, L. (2011). The essential genome of a bacterium. *Molecular Systems Biology*, 7(1), 528–528. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.58>

- Ficht, T. A., Kahl-McDonagh, M. M., Arenas-Gamboa, A. M., & Rice-Ficht, A. C. (2009). Brucellosis: The case for live, attenuated vaccines. *Vaccine*, 27, D40–D43. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.08.058>
- Garmory, H. S., & Titball, R. W. (2004). ATP-Binding Cassette Transporters Are Targets for the Development of Antibacterial Vaccines and Therapies. *Infection and Immunity*, 72(12), 6757–6763. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.6757-6763.2004>
- Godfroid, J., Cloeckaert, A., Liautard, J.-P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., ... Letesson, J.-J. (2005). From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Veterinary Research*, 36(3), 313–326. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005003>
- Goodall, E. C. A., Robinson, A., Johnston, I. G., Jabbari, S., Turner, K. A., Cunningham, A. F., ... Henderson, I. R. (2018). The Essential Genome of Escherichia coli K-12. *MBio*, 9(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02096-17>
- Grilló, M.-J., Blasco, J., Gorvel, J., Moriyón, I., & Moreno, E. (2012). What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Veterinary Research*, 43(1), 29. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-29>
- Halling, S. M., Peterson-burch, B. D., Bricker, B. J., Zuerner, R. L., Qing, Z., Li, L., ... Olsen, S. C. (2005). Completion of the Genome Sequence of Brucella abortus and Comparison to the Highly Similar Genomes of Brucella melitensis and Brucella suis. *Society*, 187(8), 2715–2726. <https://doi.org/10.1128/JB.187.8.2715>
- Hanot Mambres, D., Machelart, A., Potemberg, G., De Trez, C., Ryffel, B., Letesson, J.-J., & Muraille, E. (2016). Identification of Immune Effectors Essential to the Control of Primary and Secondary Intranasal Infection with Brucella melitensis in Mice. *The Journal of Immunology*, 196(9), 3780–3793. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502265>
- Hartigh, A. B., Rolan, H. G., de Jong, M. F., & Tsolis, R. M. (2008). VirB3 to VirB6 and VirB8 to VirB11, but Not VirB7, Are Essential for Mediating Persistence of Brucella in the Reticuloendothelial System. *Journal of Bacteriology*, 190(13), 4427–4436. <https://doi.org/10.1128/JB.00406-08>
- Jelsbak, L., Hartman, H., Schroll, C., Rosenkrantz, J. T., Lemire, S., Wallrodt, I., ... Olsen, J. E. (2014). Identification of Metabolic Pathways Essential for Fitness of Salmonella Typhimurium In Vivo. *PLoS ONE*, 9(7), e101869. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101869>
- Lauring, A. S., Jones, J. O., & Andino, R. (2010). Rationalizing the development of live attenuated virus vaccines. *Nature Biotechnology*, 28(6), 573–579. <https://doi.org/10.1038/nbt.1635>
- Lestrade P, Dricot A, Delrue RM, Lambert C, Martinelli V, De Bolle X, Letesson JJ, T. A. (2003). Attenuated signature-tagged mutagenesis mutants of Brucella melitensis identified during the acute phase of infection in mice. *Infect Immun*.

- Lestrade, P., Delrue, R.-M., Danese, I., Didembourg, C., Taminiau, B., Mertens, P., ... Letesson, J.-J. (2000). Identification and characterization of in vivo attenuated mutants of *Brucella melitensis*. *Molecular Microbiology*, 38(3), 543–551. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02150.x>
- Letesson, J.-J., Barbier, T., Zúñiga-Ripa, A., Godfroid, J., De Bolle, X., & Moriyón, I. (2017). *Brucella* Genital Tropism: What's on the Menu. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00506>
- Machelart, A., Potemberg, G., Van Maele, L., Demars, A., Lagneaux, M., De Trez, C., ... Muraille, E. (2018). Allergic Asthma Favors *Brucella* Growth in the Lungs of Infected Mice. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01856>
- Martirosyan, A., & Gorvel, J. P. (2013). *Brucella* evasion of adaptive immunity. *Future Microbiology*, 8(2), 147–154. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.140>
- McAleer, J. P., & Kolls, J. K. (2014). Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate pulmonary immune defense. *Immunological Reviews*, 260(1), 129–144. <https://doi.org/10.1111/imr.12183>
- Meltzer, E., Sidi, Y., Smolen, G., Banai, M., Bardenstein, S., & Schwartz, E. (2010). Sexually Transmitted Brucellosis in Humans. *Clinical Infectious Diseases*, 51(2), e12–e15. <https://doi.org/10.1086/653608>
- Mol, J. P. da S., França, S. de A., Paixão, T. A. da, & Santos, R. L. (2012). Laboratorial diagnosis of animal brucellosis. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 19(3), 117–126. <https://doi.org/10.4322/rbcv.2014.106>
- Monreal, D., Grillo, M. J., Gonzalez, D., Marin, C. M., De Miguel, M. J., Lopez-Goni, I., ... Moriyon, I. (2003). Characterization of *Brucella abortus* O-Polysaccharide and Core Lipopolysaccharide Mutants and Demonstration that a Complete Core Is Required for Rough Vaccines To Be Efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the Mouse Model. *Infection and Immunity*, 71(6), 3261–3271. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3261-3271.2003>
- Mosayebi, Z., Movahedian, A. H., Ghayomi, A., & Kazemi, B. (2005). Congenital brucellosis in a preterm neonate. *Indian Pediatrics*, 42(6), 599–601. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15995277>
- Palanduz, A., Palanduz, S., Güler, K., & Güler, N. (2000). Brucellosis in a mother and her young infant: probable transmission by breast milk. *International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 4(1), 55–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10689217>
- Pappas, G., Papadimitriou, P., & Akritidis, N. (2006). The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.*

- Ramírez, Y., Conde-Álvarez, R., Palacios-Chaves, L., Zúñiga-Ripa, A., Grilló, M.-J., Arce-Gorvel, V., ... Iriarte, M. (2014). The identification of wadB, a new glycosyltransferase gene, confirms the branched structure and the role in virulence of the lipopolysaccharide core of *Brucella abortus*. *Microbial Pathogenesis*, 73, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.06.002>
- Scholz, H. C., Nöckler, K., Göllner, C., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H., ... De, B. K. (2010). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(Pt 4), 801–808. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.011148-0>
- Smith, D. A., Parish, T., Stoker, N. G., & Bancroft, G. J. (2001). Characterization of auxotrophic mutants of *Mycobacterium tuberculosis* and their potential as vaccine candidates. *Infection and Immunity*, 69(2), 1142–1150. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.1442-1150.2001>
- Soler-Lloréns, P., Gil-Ramírez, Y., Zabalza-Baranguá, A., Iriarte, M., Conde-Álvarez, R., Zúñiga-Ripa, A., ... López-Goñi, I. (2014). Mutants in the lipopolysaccharide of *Brucella ovis* are attenuated and protect against *B. ovis* infection in mice. *Veterinary Research*, 45(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0072-0>
- Sternon, J.-F., Godessart, P., Gonçalves de Freitas, R., Van der Henst, M., Poncin, K., Francis, N., ... De Bolle, X. (2018). Transposon Sequencing of *Brucella abortus* Uncovers Essential Genes for Growth In Vitro and Inside Macrophages. *Infection and Immunity*, 86(8). <https://doi.org/10.1128/IAI.00312-18>
- Tobias, L., Cordes, D. O., & Schurig, G. G. (1993). Placental pathology of the pregnant mouse inoculated with *Brucella abortus* strain 2308. *Veterinary Pathology*, 30(2), 119–129. <https://doi.org/10.1177/030098589303000204>
- Truong, Q. L., Cho, Y., Barate, A. K., Kim, S., Watarai, M., & Hahn, T.-W. (2015). Mutation of purD and purF genes further attenuates *Brucella abortus* strain RB51. *Microbial Pathogenesis*, 79, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.12.003>
- van Opijnen, T., & Camilli, A. (2013). Transposon insertion sequencing: a new tool for systems-level analysis of microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 11(7), 435–442. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3033>
- Zygmunt, M. S., Hagius, S. D., Walker, J. V., & Elzer, P. H. (2006). Identification of *Brucella melitensis* 16M genes required for bacterial survival in the caprine host. *Microbes and Infection*, 8(14–15), 2849–2854. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.09.002>

Annexes

Annexe 1 : Tableau d'analyse des Tn-seq de *B. abortus* in vivo

	0,5	0	-0,5	-1	-1,5	-2	-2,5	-3	log10
									0,5 log10 More attenuated in spleen
									0,5 log10 More attenuated in lung
	ORF B. melitensis 16M	ORF B. abortus 2308	Gene name	CTRL TSB	5D IN Lung	12D IN Lung	12D IP Spleen	Predicted functions	
M	Chr1			3,4	3,4	3,2	3,4		
	Chr2			3,4	3,4	3,3	3,4		
SD	Chr1			0,4056311	0,1310385	0,533784	0,1568485		
	Chr2			0,3280115	0,1355321	0,4521435	0,1588505		
Gene total	Chr1				65	106	119		
	Chr2				21	35	36		
								Secretion	
		1 BAB2_0058	VirB11	3,322	2,776	1,3569051	2,39	type IV secretion system	
		2 BAB2_0059	VirB10	3,493	2,98	1,4249049	2,889	type IV secretion system	
		3 BAB2_0060	VirB9	3,417	2,935	1,4918744	2,983	type IV secretion system	
		4 BAB2_0061	VirB8	3,44	2,994	1,380602	3,078	type IV secretion system	
		5 BAB2_0062	VirB7	3,4	3,075	1,4568442	2,877	type IV secretion system	
		6 BAB2_0063	VirB6	3,484	2,892	1,4722987	3,093	type IV secretion system	
		7 BAB2_0064	VirB5	3,471	3,015	1,1786632	3,302	type IV secretion system	
		8 BAB2_0065	VirB4	3,364	2,858	1,1590875	3,193	type IV secretion system	
		9 BAB2_0066	VirB3	3,19	2,697	1,1869056	3,102	type IV secretion system	
		10 BAB2_0067	VirB2	3,495	2,991	1,4990865	3,372	type IV secretion system	
		11 BAB2_0068	VirB1	3,371	2,905	1,4279958	3,408	type IV secretion system	
								Metabolism AA	
		12 BAB1_0096	IluD	3,154	2,428	1,680875	2,325	Dihydroxy-acid dehydratase	leucine biosynthesis
		13 BAB1_0285	HirD	3,291	3,48	2,684	1,52	HISTIDINOL DEHYDROGENASE	histidine biosynthesis
		14 BAB1_1098	HirI	3,183	2,712	2,3194375	2,27	Phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase	histidine biosynthesis
		15 BAB1_1163	TrpD	3,272	2,621	1,78925	3,063	PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE	Tryptophan biosynthesis
		16 BAB1_1164	TrpC	3,262	2,776	2,3895625	3,243	SYNTHASE	Tryptophan biosynthesis
		17 BAB1_1293	ThrA	3,3	2,737	2,601	2,471	HOMOSERINE DEHYDROGENASE	threonine biosynthesis
		18 BAB1_1399	IluC	3,298	2,567	2,0145	1,784	KETOL-ACID REDUCTOISOMERASE	leucine biosynthesis
		19 BAB1_1583	LouA	3,37	2,792	2,199375	2,76	2-ISOPROPYLMALATE SYNTHASE	leucine biosynthesis
		20 BAB1_1586	TrpE	3,416	2,896	2,278	3,33	ANTHRANILATE SYNTHASE	Tryptophan biosynthesis
		21 BAB1_1851	ProA	2,536	2,125	1,795625	1,692	REDUCTASE (GPR)	proline biosynthesis
		22 BAB1_1905	LouC	3,03	2,507	1,923125	2,403	LARGE SUBUNIT	leucine biosynthesis
		23 BAB1_1918	Lp4A2	2,706	2,433	2,028125	1,992	DIHYDROLIPOAMIDE DEHYDROGENASE	metabolism AA
		24 BAB1_1984	LysA	2,038	0,344	0,2560625	0,466	DIAMINOPIMELATE DECARBOXYLASE	lysine biosynthesis
		25 BAB1_1988	HirC	2,289	1,328	0,7958125	0,726	AMINOTRANSFERASE	histidine biosynthesis
		26 BAB1_2082	HirB	3,036	2,506	1,5799375	2,167	DEHYDRATASE	histidine biosynthesis
		27 BAB1_2084	HirH	2,96	2,169	1,1910625	1,836	AMIDOTRANSFERASE/HISH	histidine biosynthesis
								PHOSPHORIBOSYLFORMIMINO-5-AMINOIMIDAZOLE CARBOXAMIDE	
		28 BAB1_2085	HirA	2,923	1,818	1,3005	1,553	RIBOTIDE ISOMERASE	histidine biosynthesis
		29 BAB1_2086	HirF	2,936	2,222	0,852125	1,786	HISF PROTEIN	histidine biosynthesis
		30 BAB1_2087	HirE	3,478	3,197	2,6743125	2,72	PHOSPHORIBOSYL-ATP PYROPHOSPHATASE	histidine biosynthesis
		31 BAB2_0043		2,535	2,533	2,223375	1,069	N-formylglutamate deacetylase	histidine biosynthesis
		32 BAB2_0183	HirG	3,012	2,049	1,3960565	1,428	ATP PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE	histidine biosynthesis
		33 BAB2_0346	LouB	3,241	2,783	2,0080547	2,819	3-ISOPROPYLMALATE DEHYDROGENASE	leucine biosynthesis
		34 BAB2_0353	LouD	3,189	2,858	2,0224789	2,729	SMALL SUBUNIT	leucine biosynthesis
		35 BAB2_1012	DapB	2,557	1,859	2,2172056	1,626	DIHYDRODIPICOLINATE REDUCTASE	lysine biosynthesis
								Protein modifications and degradation	
		36 BAB1_0162		2,914	2,071	1,7308125	2,159	Heat shock protein Hsp20	chaperone
		37 BAB1_0635	HtrA/Hsp90	3,037	1,192	1,16025	1,618	PROTEASE D0	
		38 BAB1_1162	PpiD	3,208	2,863	2,5999375	2,967	ISOMERASE D	chaperone
		39 BAB1_1191	ClpA	2,592	1,336	0,452625	0,566	ATP-DEPENDENT CLP PROTEASE ATP-BINDING SUBUNIT CLPA	chaperone
		40 BAB1_1192	ClpS	3,016	2,257	1,0795	1,193	PROTEINYLJA	chaperone
		41 BAB1_1437	PspP	1,878	0,594	0,240125	0,637	XAA-PRO AMINOPEPTIDASE	
		42 BAB1_1532	CspA	3,186	2,442	1,238875	1,609	COLD SHOCK PROTEIN CSPA	chaperone
		43 BAB1_1657	DsbB	2,48	1,444	0,7426875	0,915	DISULFIDE BOND FORMATION PROTEIN B	
		44 BAB1_1846		2,415	1,965	0,7448125	0,697	Peptidase M23/M37	
		45 BAB1_1866	PspM23	2,412	2,159	0,8219375	0,396	LYSOSTAPHIN	
		46 BAB1_2025	DnaJ	2,396	2,458	2,07825	0,947	Molecular chaperones (DnaJ family)	chaperone

								Nucleic acid synthesis and RNA modification		
		47	BAB1_0472	PurF	1,738	1,512	0,5599375	0,867	AMIDOPHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE	Purine
		48	BAB1_0704	KrqA	2,619	2,14	2,00175	1,859	DIMETHYLADENOSINE TRANSFERASE	RNA modification
		49	BAB1_0861	PurS	2,599	2,097	1,2803125	2,313	Phosphoribosylformylglycinamidinosynthase	purine synthesis
		50	BAB1_1665	RpsH2	2,915	2,422	1,617125	1,222	RNA POLYMERASE SIGMA-32 FACTOR	RNA modification
		51	BAB1_2063	TrmE	2,344	2,046	2,0708125	1,139	THIOPHENE AND FURAN OXIDATION PROTEIN THOF	tRNA modification
		52	BAB2_0182	HirZ	3,014	2,218	1,7030859	1,56	HISTIDYL-TRNA SYNTHETASE	tRNA modification
		53	BAB2_0995	TruA	2,895	2,381	2,3717506	1,983	TRNA PSEUDOURIDINE SYNTHASE A	tRNA modification
		54	BAB2_0845		2,91	2,876	2,7189617	2,26	16S ribosomal RNA m(5)C 967 methyltransferase	ribosomal protein
									DNA repair	
		55	BAB1_0003	RecF	2,54	2,359	2,2238125	1,749	Recombination protein F	DNA repair
		56	BAB1_0281	maf	2,636	2,356	1,7796875	1,689	dTTP/dUTP pyrophosphatase	DNA repair
		57	BAB1_0684	RecO	2,528	2,31	2,0771875	1,821	DNA REPAIR PROTEIN RECO	DNA repair
		58	BAB1_1440	RecH	2,422	2,413	2,4915625	1,601	DNA REPAIR PROTEIN REC H	DNA repair
		59	BAB2_0659	RecG	2,759	2,487	2,1924784	1,474	ATP-DEPENDENT DNA HELICASE REC G	DNA repair
									Cell envelope	
		60	BAB1_0045	TamA	3,239	2,123	1,884875	2,381	Outer membrane protein	envelope
		61	BAB1_0046	TamB	3,12	1,976	1,4460625	1,975	Outer membrane protein	envelope
		62	BAB1_0069	EtaE	3,298	3,322	3,0334375	1,841	Cell surface protein	Adhesion
		63	BAB1_0351	LsdB	2,595	1,405	1,272875	2,308	GLYCOSYLTRANSFERASE	LPS
		64	BAB1_0534	WbkD	3,116	1,074	0,5790625	1,875	CAPD PROTEIN	LPS
		65	BAB1_0535	WbkF	2,838	0,415	0,3049375	1,864	PUTATIVE UNDECAPRENYL-PHOSPHATE ALPHA-N-	LPS
		66	BAB1_0542	Wat	2,454	0,18	0,1923125	1,473	O-ANTIGEN EXPORT SYSTEM ATP-BINDING PROTEIN RFBB	LPS
		67	BAB1_0543	Wzm	2,183	0,23	0,269875	1,416	PROTEIN RFBD	LPS
		68	BAB1_0544	Por	2,608	0,393	0,5599375	1,291	PEROSAMINE SYNTHETASE	LPS
		69	BAB1_0545	Gmd	3,349	0,918	0,3091875	1,939	GDP-mannose 4,6-dehydratase	LPS
		70	BAB1_0553	WbkA	3,044	0,994	0,3856875	1,711	MANNOSYLTRANSFERASE	LPS
		71	BAB1_0563	WbkE	3,322	0,974	0,6109375	1,665	MANNOSYLTRANSFERASE C	LPS
		72	BAB1_0607		2,945	3,097	2,2790625	2,627	glycyltransferase	envelope
		73	BAB1_0630	Omp	2,361	2,584	2,176	1,615	Outer membrane lipoprotein-related protein	envelope
		74	BAB1_0804		2,468	2,723	2,4171875	0,775	PUTATIVE CAPSULE POLYSACCHARIDE EXPORT PROTEIN PRECURSOR	envelope
		75	BAB1_0931	AmiC	2,326	1,903	0,801125	0,547	AMIDASE	envelope
		76	BAB1_0999	WbaA	3,109	0,682	0,17425	1,771	GLYCOSYLTRANSFERASE	LPS
		77	BAB1_1000	WbdA	2,944	0,63	0,323	1,391	MANNOSYLTRANSFERASE	LPS
		78	BAB1_1217	Muri	3,12	2,195	0,9934375	1,331	GLUTAMATE RACEMASE	envelope
		79	BAB1_1522	WadC	3,395	2,69	2,186625	2,38	LIPOPOLYSACCHARIDE CORE BIOSYNTHESIS	
		80	BAB1_1930	Omp19	3,571	2,856	1,45775	1,626	MANNOSYLTRANSFERASE LPOC	envelope
		81	BAB2_0076	Omp10	2,548	2,393	1,3064204	1,235	OUTER MEMBRANE LIPOPOTEIN	envelope
		82	BAB2_0099		2,77	2,882	2,318175	0,985	SUCCINOGLYCAN BIOSYNTHESIS	
		83	BAB2_0855	ManB	3,448	0,952	0,3963625	2,562	TRANSPORT PROTEIN EXOP	LPS synthesis
									PHOSPHOMANNOMUTASE	LPS synthesis
									Regulation transcription	
		84	BAB1_0507	FdoA	2,362	1,905	0,8630625	0,582	Diquanolate cyclase/phosphodiesterase domain 2 (EAL)	second messenger regulator
		85	BAB1_0636	TecR	3,3	1,557	2,3194375	2,094	REGULATOR	regulator
		86	BAB1_1056	DkrA	2,278	1,427	0,5641875	0,703	DNAX SUPPRESSOR PROTEIN HOMOLOG	transcriptional regulator
		87	BAB1_1201	MorI	3,349	2,866	2,69025	1,989	TRANSCRIPTIONAL REGULATOR, MERR FAMILY	transcriptional regulator
		88	BAB1_1397	ArpB	3,138	2,485	2,2525	2,999	TRANSCRIPTIONAL REGULATOR, GNTR FAMILY / MULTIPLE SUBSTRATE AMINOTRANSFERASE	transcriptional regulator
		89	BAB1_1400	TotR5	3,099	2,417	2,1706875	2,225	TRANSCRIPTIONAL REGULATOR, TETR FAMILY	transcriptional regulator
		90	BAB1_1517	LysR21	2,528	0,775	0,48025	1,159	TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN, LYSR FAMILY	transcriptional regulator
		91	BAB1_1962	GntR13	2,788	2,867	2,972875	1,655	TRANSCRIPTIONAL REGULATOR, GNTR FAMILY	transcriptional regulator
		92	BAB1_1981	TlpA	2,577	2,465	2,1685625	1,085	THIOL-DISULFIDE INTERCHANGE PROTEIN TLP A	temperature sensing
		93	BAB1_2092	burR	3,046	0,527	0,6321875	0,764	TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN CHW1	transcriptional regulator
		94	BAB1_2093	burS	2,412	0,287	0,1795625	0,429	SENSOR PROTEIN CHVG	transcriptional regulator
		95	BAB1_2155		3,221	2,689	2,41825	2,296	PHOH PROTEIN	Phosphate regulation

	96	BAB2_0021	RpoE2	2,285	0,709	0,8520581	1,082	EXTRACYTOSOLIC FUNCTION ALTERNATIVE SIGMA FACTOR	transcriptional regulator
	97	BAB2_0031	StcA	3,24	3,38	2,967264	2,15	PROTEIN HYD	transcriptional regulator
	98	BAB2_0118	VjbR	3,3	2,736	1,0550272	1,804	FAMILY	transcriptional regulator
	99	BAB2_0143	DnaR1	2,877	2,587	1,8669036	1,361	REPRESSOR	transcriptional regulator
	100	BAB2_0308		2,774	2,227	1,9132671	1,971	HISTIDINE UTILIZATION REPRESSOR	regulation
	101	BAB2_0378	DnaR3	2,746	2,1	1,6835102	1,357	FAMILY	transcriptional regulator
	102	BAB2_0465		3,337	3,789	3,492717	2,59	TRANSCRIPTIONAL REGULATOR AZLB	transcriptional regulator
	103	BAB2_0527	RpiR2	3,096	2,712	2,4552049	2,356	FAMILY	transcriptional regulator
								Transport	
	104	BAB1_0322		3,215	3,244	2,06125	1,698	ACRIFLAVIN RESISTANCE PROTEIN A PRECURSOR	secretion protein HlyD
	105	BAB1_0323	MexB	3,071	3,024	1,706375	1,331	MULTIDRUG RESISTANCE PROTEIN MEXB	transporter
	106	BAB1_1038		2,317	1,378	0,4366875	0,642	TOLUENE TOLERANCE PROTEIN TTG2B	transporter
	107	BAB1_1039		2,473	1,588	0,5355	0,6	PROTEIN	transporter
	108	BAB1_1040		2,274	1,577	0,255	0,705	TOLUENE TOLERANCE PROTEIN TTG2C	transporter
	109	BAB1_1041		2,536	1,951	0,53975	0,757	containing protein	transporter
	110	BAB1_1064		2,784	2,277	1,8689375	2,118	Isolator ABC transporter, precursor protein, galactose	transporter
	111	BAB1_1345	RarB	2,515	2,451	1,7350625	1,979	POTASSIUM/PROTON ANTIPORTER ROSE	transporter
	112	BAB1_1692		3,213	2,534	1,19	2,139	PROLINE/BETAINE TRANSPORTER	transporter
	113	BAB1_2054	AbcB	3,02	2,485	2,178125	2,609	BINDING PROTEIN	transporter
	114	BAB1_2056	AbcA	2,845	2,199	1,581	2,259	ABC TRANSPORTER INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN	transporter
	115	BAB1_2057	phnG2	2,873	2,234	1,64475	2,163	PROTEIN	transporter
	116	BAB2_0094		3,269	2,933	2,4449019	2,524	Nickel/cobalt efflux system	transporter
	117	BAB2_0412		3,234	2,155	1,7030859	1,742	PERMEASE	transporter
								Metabolism	
	118	BAB1_0113	FixR	2,926	2,96	1,9603125	0,714	Oxidoreductase	
	119	BAB1_0248		3,22	2,683	2,3428125	2,585	Mandelate racemase	Metabolism C
	120	BAB1_0318		3,056	2,378	1,034875	2,224	PHOSPHOGLYCOLATE PHOSPHATASE	Metabolism C
	121	BAB1_0525	Pp4K	3,28	3,438	2,0145	1,274	PYRUVATE, PHOSPHATE DIKINASE	Metabolism C
	122	BAB1_0638	GlnE	2,997	2,131	1,247375	1,54	GLUTAMATE-AMMONIA-LIGASE ADENYLYLTRANSFERASE	Metabolism N
	123	BAB1_0734	galE	3,687	3,36	2,9803125	1,994	UDP-GLUCOSE 4-EPIMERASE	Metabolism C
	124	BAB1_1024	GlnB	2,427	2,297	2,12075	1,509	NITROGEN REGULATORY PROTEIN P-II	Metabolism N
	125	BAB1_1819	AcrA	3,227	2,845	2,6636875	2,852	ACETYL-COENZYME A SYNTHETASE	metabolism C
	126	BAB1_2068		2,065	1,617	2,033625	1,419	Putative pyruvate, phosphate dikinase regu	metabolism C
	127	BAB1_2103		2,789	2,258	1,9433125	1,224	MANNOSE-1-PHOSPHATE GUANYLTRANSFERASE	metabolism C
	128	BAB1_2178	GyaR	2,805	2,31	2,263125	2,503	glucanase 2-dehydrogenase	metabolism C
	129	BAB2_0162		3,445	3,424	3,0641122	2,55	ALPHA-METHYLACYL-COA RACEMASE	metabolism
	130	BAB2_0442		2,563	1,448	0,4049079	1,244	ACYL-COA DEHYDROGENASE	metabolism
	131	BAB2_0471	GlnA	3,339	3,091	2,9373853	2,384	GLUTAMINE SYNTHETASE	Metabolism N
								Other	
	132	BAB1_0172	rph	2,929	3,011	2,6806875	1,69	ribonuclease	
	133	BAB1_0283	AcrC	2,956	2,257	1,9071875	2,238	Arsenate reductase	
	134	BAB1_0427		3,044	2,705	2,263125	1,288	METHYLTRANSFERASE	
	135	BAB1_1015	TatD	2,894	2,773	2,63075	1,744	TatD-related deoxyribonuclease	
	136	BAB1_1016		2,902	2,618	1,894375	1,67	Beta-lactamase-like	
	137	BAB1_1458	MraW	2,322	1,232	1,200625	1,018	SAM-DEPENDENT METHYLTRANSFERASE	
	138	BAB1_1485	PncA	2,593	2,845	2,0655	0,863	INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN	Nicotinamide/pyrazinamide
	139	BAB1_1546		3,242	3,289	2,98775	1,795	polyphenol oxidase	quinone
	140	BAB1_1553	YehF	2,359	2,396	2,3831875	1,296	GTP-BINDING PROTEIN	ribosomal protein
	141	BAB1_1557	PotC	2,3	2,266	2,1685625	1,621	CYTOCHROME C1	electron transport chain
	142	BAB1_1666		2,558	2,372	2,2355	1,949	RIBOSOMAL LARGE SUBUNIT PSEUDOURIDINE SYNTHASE D	ribosomal protein
	143	BAB1_1691		3,32	1,14	1,8540625	2,125	Rubroerythrin	antioxidant
	144	BAB1_1705	CpaB	2,01	1,719	1,3738125	1,288	Cell division coordinator	cell division
	145	BAB1_1827	GdhZ	3,315	3,022	2,8634375	2,351	DEHYDROGENASE	cell division
	146	BAB1_2005		2,555	2,605	1,7563125	1,236	CAMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE REGULATORY SUBUNIT	lysophospholipase
	147	BAB1_2022	CobT	1,929	1,724	1,4991875	1,023	COB T PROTEIN	cofactor synthesis
	148	BAB1_2023	CobS	2,135	1,948	1,683	0,93	COB S PROTEIN	cofactor synthesis
	149	BAB1_2024		2,878	3,08	2,526625	0,807	unknown	acyl-CoA dehydrogenase (blat rhadococcus)
	150	BAB1_2158	Int	2,938	2,686	2,1026875	1,849	APOLIPOPROTEIN N-ACYLTRANSFERASE	lipoprotein synthesis
	151	BAB2_0119	FlhN	3,14	2,947	2,8621734	1,992	Flagellar protein	
	152	BAB2_0246	CobW	3,244	2,739	2,070903	2,751	MEMBRANE PROTEIN	cofactor synthesis
	153	BAB2_0350		3,159	2,704	1,9565397	1,952	OSMOTICALLY INDUCIBLE PROTEIN C	oxidative stress resistance
	154	BAB2_0535	SodC	3,104	2,959	2,7323556	1,684	SUPEROXIDE DISMUTASE (CU-ZN)	oxidative stress resistance

155	BAB2_0545	RibE	2,579	1,109	1,492,9047	1,674	SYNTHASE	riboflavin synthase	
							Unknown		
156	BAB1_0070		3,075	3,149	3,60825	1,631	hypothetical protein	Invasion associated factor IalB	
157	BAB1_0088		3,452	3,502	3,60825	1,867	hypothetical exported protein	Putative secreted protein (blast aminobacter)	
158	BAB1_0284		3,039	3,348	1,802	1,715	hypothetical protein		
159	BAB1_0491		2,549	0,973	0,6109375	0,581	hypothetical protein	Invasion associated factor IalB	
160	BAB1_0606		3,096	3,141	2,4055	2,917	hypothetical protein	unknown	
161	BAB1_0627		2,459	2,343	1,4025	0,955	hypothetical exported protein	unknown	
162	BAB1_0771		2,506	2,03	1,850875	1,37	Hypothetical Zinc finger Protein	unknown	
163	BAB1_1092		2,795	2,731	1,2569375	0,911	hypothetical protein	unknown	
164	BAB1_1159		2,745	2,54	1,83175	2,403	OXIDOREDUCTASE CAIA	unknown	
165	BAB1_1202		3,326	2,89	2,0474375	2,76	hypothetical protein	unknown	
166	BAB1_1283		3,407	2,852	1,581	2,42	Hypothetical Cytaralic Protein	unknown	
167	BAB1_1423		2,327	2,056	1,43225	0,881	hypothetical protein	unknown	
168	BAB1_1494	bp26 / Omp2	3,348	3,02	2,2280625	1,924	PERIPLASMIC IMMUNOGENIC PROTEIN	unknown	
169	BAB1_1526		2,329	2,101	1,8455625	1,592	hypothetical protein	unknown	
170	BAB1_1543		2,817	2,297	1,85725	1,35	hypothetical protein	unknown	accessory factor Ubik (blast brucellaceae)
171	BAB1_1693		2,917	2,719	1,938	1,61	hypothetical transcription regulator	unknown	
172	BAB1_1844	IalA	2,926	2,338	1,9539375	2,494	INVASION PROTEIN A		
173	BAB1_1947		2,775	2,81	2,9994375	1,366	hypothetical protein	unknown	
174	BAB1_2009		2,84	2,777	3,032375	2,196	Hypothetical Membrane Spanning Protein	unknown	
175	BAB2_0095		3,352	2,939	2,3779324	2,821	Hypothetical Protein	unknown	
176	BAB2_0147		2,584	1,642	2,8570219	1,887	Hypothetical Protein	unknown	
177	BAB2_0163		3,296	3,109	2,6334468	1,929	Hypothetical Cytaralic Protein	3-methylfumaryl-CoA hydratase (blast paracoccus)	
178	BAB2_0345		2,745	2,183	2,0379334	1,603	conserved cytaralic protein	unknown	
179	BAB2_0411		3,199	2,207	1,689692	1,809	Protein	unknown	
180	BAB2_0623		3,116	3,037	2,9507792	2,228	Hypothetical Protein	unknown	